

Université de Montréal

Études Structurales par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du Site Actif du Ribozyme  
VS de *Neurospora*.

Par

Geneviève Desjardins-Séguin

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
Maître (M.Sc.) en Biochimie.

Novembre 2008

© Geneviève Desjardins-Séguin, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études Structurales par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du Site Actif du Ribozyme  
VS de *Neurospora*.

Présenté par :

Geneviève Desjardins-Séguin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand  
Président-rapporteur

Pascale Legault  
Directeur de recherche

Christian Baron  
Membre du jury

## Résumé en français

**Mots-clefs** : ARN, ribozyme VS de *Neurospora*, structure tridimensionnelle, catalyse, pKa, résonance magnétique nucléaire (RMN).

Nous étudions le ribozyme VS de *Neurospora*, en tant que système modèle, pour augmenter nos connaissances sur la relation entre la structure et la fonction chez les ARNs, ainsi que pour mieux comprendre le mécanisme de clivage de ce ribozyme. Il a été proposé précédemment que la boucle interne A730 dans la tige-boucle VI (SLVI) contient le site actif du ribozyme et lie un ou plusieurs ions métalliques qui pourraient participer au mécanisme réactionnel. Nous avons déterminé par spectroscopie RMN la structure de la tige-boucle SLVI contenant la boucle A730 afin d'éclaircir ce mécanisme. La structure obtenue est en accord avec les études biochimiques antérieures et présente un ou plusieurs sites de liaison au magnésium associé à la boucle interne. Suite à des études de cinétique et de mutagenèse, il a été proposé qu'une adénine localisée dans le site actif, A756, participe à la catalyse par acide/base générale. Des études de pH effectuées précédemment ont identifié un pKa catalytique (5.2-5.8) qui correspond probablement à l'équilibre de protonation du A756. À l'aide de méthodes utilisant le carbone-13, nous avons identifié un pKa modifié appartenant au A756, ce qui supporte le rôle de ce résidu dans la catalyse par acide/base générale. Les études structurales présentées ici aident donc à augmenter notre compréhension du mécanisme de clivage chez le ribozyme VS.

## Abstract

**keywords :** RNA, *Neurospora* VS ribozyme, three-dimensional structure, catalysis, pKa, nuclear magnetic resonance (NMR)

We are studying the *Neurospora* VS ribozyme as a model system to increase our knowledge of the structure-function relationship in RNA and to better understand the mechanism of the cleavage reaction. It has been previously postulated that the A730 internal loop of stem-loop VI (SLVI) forms the active site of the VS ribozyme and binds magnesium ion(s) that may participate in catalysis. To get insights into the catalytic mechanism, we have determined by NMR spectroscopy the structure of a SLVI fragment containing the A730 loop. The structure we obtained is in agreement with previous biochemical studies and contains one or more magnesium-ion binding sites in the active site. Based on kinetic and mutagenesis studies, it has been proposed that an adenine in the A730 loop, A756, is important for catalysis and may participate in general acid/base catalysis. Previous pH-dependent enzymatic studies identified a catalytic pKa of 5.2-5.8, which likely corresponds to the protonation equilibrium of this A756 adenine in the A730 loop. Using  $^{13}\text{C}$  NMR methods, we have identified a shifted pKa for A756, which gives additional support to the role of this residue in the general acid/base mechanism. The NMR studies presented here therefore increase our understanding of the cleavage reaction in the VS ribozyme.

## Table des Matières

Résumé en français.....	iii
Abstract.....	iv
Table des Matières .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations .....	x
Remerciements.....	xi
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Acides Ribonucléiques.....	1
1.1.1 Généralités sur l'ARN .....	1
1.1.2 Importance médicale des ARNs.....	1
1.2 Les Ribozymes .....	3
1.2.1 Découverte des ribozymes .....	3
1.2.2 Des métalloenzymes?.....	6
1.2.3 Le monde de l'ARN.....	7
1.3 Le Ribozyme VS de <i>Neurospora</i> .....	9
1.3.1 Description du ribozyme VS de <i>Neurospora</i> .....	9
1.3.2 Structures secondaire et tertiaire .....	9
1.3.3 Le site actif.....	16
1.3.4 Mécanisme proposé.....	18
1.3.5 Rôle des ions métalliques .....	24
1.4 Hypothèses et Objectifs .....	30
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes .....	34
2.1 Synthèse de l'ARN.....	34
2.1.1 Préparation des échantillons d'ARN .....	34
2.1.2 Gels natifs.....	34
2.2 Études de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	35
2.2.1 Spectroscopie RMN .....	35
2.2.2 Contraintes structurales .....	36
2.2.3 Calculs des structures.....	36

2.3 Études des pKas.....	37
2.3.1 Études de pH.....	37
2.3.2 Détermination du pKa des adénines.....	37
Chapitre 3 : Résultats .....	38
3.1 Conformation de l'ARN SLVI .....	38
3.2 Effets du Magnésium et du pH.....	41
3.3 Attribution des Signaux de l'ARN SLVI .....	44
3.3.1 Protons échangeables .....	45
3.3.2 Protons non-échangeables des riboses.....	48
3.3.3 Protons non-échangeables des bases.....	52
3.3.4 Corrélation des protons échangeables et non-échangeables .....	55
3.4 Structure de l'ARN SLVI .....	56
3.4.1 Calcul des structures .....	56
3.4.2 Motifs présents dans l'ARN SLVI .....	58
3.5 PKa des Adénines dans la Boucle Interne.....	62
3.6 Clivage du Fragment SLVI.....	66
Chapitre 4 : Discussion .....	69
4.1 Pertinence de la Structure du Site Actif .....	69
4.1.1 Comparaison avec les études de protection / déprotection chimiques .	69
4.1.2 Comparaison avec les études de mutagenèse .....	72
4.1.3 Importance des groupements 2'-OH .....	75
4.1.4 Corrélations entre la structure et les sites de liaison au magnésium ....	75
4.2 Motif « S-turn » .....	76
4.3 Rôle des pKas Modifiés dans le Site Actif du Ribozyme VS .....	79
4.4 Comparaison Entre les Deux Structures du Site Actif.....	81
Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives .....	84
5.1 Conclusions .....	84
5.2 Perspectives .....	85
Annexe 1 : Attribution des Signaux de l'ARN SLVI.....	87
Références .....	91

## Liste des tableaux

Tableau I : Statistiques sur le calcul de la structure moyenne de l'ARN SLVI.	57
Tableau II : Liste des NOEs qui induisent la formation du « S-turn » dans l'ARN SLVI.	78

## Liste des figures

Figure 1 : Structures secondaires et tertiaires des ribozymes naturels connus à ce jour.	5
Figure 2 : Structures primaire et secondaire du fragment responsable de l'activité enzymatique du ribozyme VS de <i>Neurospora</i> .	11
Figure 3 : Structures tridimensionnelles des deux jonctions 3-voies dans le ribozyme VS.	12
Figure 4 : Vue stéréo de la modélisation à basse résolution du fragment actif dans le ribozyme VS.	13
Figure 5 : Mécanisme réactionnel du clivage et de la ligation du substrat par le ribozyme VS.	18
Figure 6 : Illustration des deux mécanismes proposés pour la réaction de clivage du ribozyme VS de <i>Neurospora</i> .	23
Figure 7 : Représentation chimique du cobalt hexammine et du magnésium hexahydraté.	25
Figure 8 : « Inner et outer binding sphere » du magnésium dans l'ARN.	26
Figure 9 : Résumé des phosphates dans le ribozyme VS qui sont sensibles aux substitutions par des phosphorothioates.	27
Figure 10 : Localisation des sites de liaison aux ions divalents dans la tige-boucle V.	28
Figure 11 : Structures primaire et secondaire du fragment SLVI utilisé pour les études de RMN.	32
Figure 12 : Représentation de l'équilibre entre les conformations « hairpin » et duplexe de l'ARN SLVI.	38
Figure 13 : Évaluation de la conformation du fragment SLVI par gel natif.	40
Figure 14 : Représentation schématique de paires de bases Watson-Crick.	41
Figure 15 : Région des protons iminos dans le spectre $^1\text{H}$ 1D du fragment SLVI en présence de diverses concentrations de $\text{MgCl}_2$ .	42
Figure 16 : Région des protons iminos dans le spectre $^1\text{H}$ 1D du fragment SLVI à différents pH en présence de 5 mM de $\text{MgCl}_2$ .	44
Figure 17 : Région des protons iminos confirmant la structure secondaire de l'ARN SLVI.	46
Figure 18 : Régions du spectre $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ CPMG-NOESY démontrant la présence d'une paire de bases G-A symétrique dans la boucle interne.	47
Figure 19 : Identification de la fréquence et attribution des protons du ribose appartenant au résidu A2.	50



Figure 20 : Région des riboses du spectre DQF-COSY acquis à 25 °C sur l'ARN SLVI.	52
Figure 21 : Exemple de la marche séquentielle entre deux nucléotides consécutifs.	54
Figure 22 : Vue stéréo de la structure du fragment SLVI.	58
Figure 23 : Caractéristiques de la boucle interne du fragment SLVI.	60
Figure 24 : Schéma des NOEs identifiés dans le domaine de la boucle A730 de l'ARN SLVI.	61
Figure 25 : Titrage du pH de l'ARN SLVI marqué en $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ pour démontrer la présence de pKa modifiés.	63
Figure 26 : Représentation graphique de l'équation de Henderson-Hasselbalch à différents pH pour les adénines ayant un pKa modifié dans le fragment SLVI.	65
Figure 27 : Spectre 1D du phosphore acquis sur le fragment SLVI.	67

## Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARN<sub>mt</sub> : ARN mitochondrial(aux)

FRET : Fluorescence resonance energy transfer

nt : nucléotide(s)

NAIM : Nucleotide analogue interference mapping

NOE : Nuclear Overhauser Effect

pb : paire(s) de bases

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SELEX : Systematic evolution of ligand by exponential enrichment

VHD : Virus de l'hépatite  $\delta$

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

## Remerciements

Je voudrais premièrement remercier ma directrice de recherche, Pascale Legault, qui a grandement contribué à ma formation scientifique. Je tiens aussi à dire un grand merci aux membres des laboratoires Legault et Omichinski pour leur soutien moral dans les moments difficiles et pour les soirées passées à discuter de tout et de rien devant une ou plusieurs bières. La contribution de chacun a fait que j'ai passé trois agréables années dans un environnement tout à fait stimulant en compagnie de bons amis. Ces mots ne rendent cependant pas justice à tout ce que j'ai vécu durant ma maîtrise, ni à l'émotion que je ressens en repensant à ces trois années qui ont passées trop rapidement. Je garde d'excellents souvenirs de chacun d'entre vous.

Par ailleurs, le projet de recherche décrit ici n'aurait pas été possible sans la contribution de plusieurs institutions pour le financement. Je tiens donc à remercier le Fond québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), la Faculté des études supérieures (FES), ainsi que la fondation Luigi-Liberatore pour leur support financier.

Encore une fois, merci à tous pour votre soutien.

## Chapitre 1: Introduction

### **1.1 Acides Ribonucléiques**

#### 1.1.1 Généralités sur l'ARN

Durant le dernier siècle, plusieurs groupes de recherche ont contribué à accroître les connaissances sur l'ARN afin de mieux comprendre le rôle joué par celui-ci dans les divers processus biochimiques. Grâce à ces études, il est rapidement devenu évident que l'ARN ne servait pas seulement de messenger entre l'ADN et les protéines. Il est maintenant connu que les ARNs sont impliqués dans plusieurs processus fondamentaux. Par exemple, l'ARN est utilisé dans la traduction (ARNt et ARNr), ainsi que dans la régulation des gènes (ARNmi, ARNsi, ARNa, ARNpi, ARNtasi et riboswitch) chez les eucaryotes et les plantes. Il est aussi impliqué dans la modification (ARNsno), dans l'épissage (ARNsn) et le clivage d'ARN (ribozymes et ARNsi). Par ailleurs, plusieurs virus possèdent un génome composé uniquement d'ARN. Ils l'utilisent donc comme transporteur d'information, ainsi que pour leur propagation. Il est maintenant évident que les fonctions de l'ARN sont multiples et touchent plusieurs sphères d'intérêts. Ces champs de recherche sont encore aujourd'hui en expansion. Les connaissances acquises jusqu'à ce jour ouvrent désormais la voie pour utiliser l'ARN en tant qu'agent thérapeutique et comme outil biochimique.

#### 1.1.2 Importance médicale des ARNs

Étant donné que l'ARN peut adopter une panoplie de conformations et affecter beaucoup de processus fondamentaux, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'exploiter les propriétés variées de l'ARN pour en faire un agent thérapeutique. Plusieurs approches ont été explorées, certaines avec plus de succès que d'autres. L'une des techniques répandues consiste à empêcher l'expression de certains gènes qui sont problématiques (Sullenger and Gilboa 2002). Ces gènes sont réprimés en utilisant des ARNs interférents, des ARNs anti-sens, des aptamères et des ribozymes.

Les ARNs anti-sens (Green, Pines et al. 1986) et interférents (Fire, Xu et al. 1998) sont des fragments d'ARN, respectivement simple et double brins, qui répriment l'expression de gènes spécifiques. La séquence de l'ARN est variable selon le gène à inhiber, car elle doit correspondre à la séquence cible de l'ARN messager qui est visé. Suite à la liaison entre l'ARN thérapeutique et l'ARN cible, le complexe est dégradé par la cellule, ce qui permet de réprimer l'expression du gène en question. Bien que cette approche soit prometteuse, il reste certains aspects à améliorer comme la livraison de l'ARN thérapeutique au bon endroit et la limitation au niveau de la spécificité puisque ces ARNs utilisent uniquement une reconnaissance de la structure secondaire. Étant donné que l'ARN thérapeutique est dégradé en même temps que l'ARN cible, il est aussi important qu'une grande quantité de l'ARN inhibiteur soit exprimée dans un endroit restreint (van der Krol, Mol et al. 1988), ce qui peut s'avérer problématique dans certains cas.

Les ribozymes, qui sont des ARNs avec une activité catalytique, sont apparus comme une solution au problème de la quantité d'ARN inhibiteur. En effet, ces enzymes sont recyclables : le ribozyme lie son substrat, effectue le clivage de l'ARN à un endroit précis et relâche les produits. Il n'est donc plus nécessaire d'avoir une grande quantité d'ARN, mais il doit être localisé au bon endroit. Les essais cliniques de phases I et II sont effectués principalement avec deux ribozymes de petites tailles qui sont bien caractérisés : le « hammerhead » et le « hairpin ». Ces essais cliniques visent principalement le VIH (Ngok, Mitsuyasu et al. 2004; Li, Li et al. 2006; Rossi, June et al. 2007; Scherer, Rossi et al. 2007), qui est un virus à ARN, ainsi que certaines formes de cancer comme le cancer du sein et le cancer du colon (Sullenger and Gilboa 2002).

L'une des plus grandes réussites, comme ARN thérapeutique, est sûrement l'introduction des aptamères. Ces fragments d'ARN synthétiques lient des séquences spécifiques sur des protéines avec une haute affinité. Ce faisant, ils empêchent la liaison entre une protéine prédéterminée et son ARN cible. Ces ARNs sont généralement produits par SELEX (Ellington and Szostak 1990), dans le but de trouver le candidat avec la meilleure affinité. Le premier aptamère utilisé comme médicament, Macugène (Vinores 2006), est arrivé sur le marché il y a quelques années. Il permet de traiter les gens qui souffrent de la

dégénérescence maculaire liée à l'âge (MDA). Cette maladie retrouvée généralement chez les adultes d'un certain âge cause éventuellement la cécité. Le traitement avec Macugène empêche la détérioration de la vue, ralentit le processus de la maladie et même dans certains cas, améliore la vue des patients. Un deuxième aptamère, le ARC1779, est maintenant en essais cliniques de phase II (Gilbert, DeFeo-Fraulini et al. 2007). Cet aptamère semble un candidat prometteur pour traiter les gens qui souffrent d'un trouble rare relié au sang, la purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

Bien que cette revue ne soit pas exhaustive, elle démontre que dans les dernières années, beaucoup d'efforts ont été investis dans la recherche de médicaments composés d'ARN. Les progrès accomplis sont considérables, mais il reste encore beaucoup de défis à relever pour développer ce type de médicaments. Des efforts sont nécessaires, entre autres, pour mieux comprendre le trafic cellulaire et de nouvelles techniques doivent être développées pour amener les molécules d'ARN au bon endroit, dans le bon compartiment cellulaire. D'autres percées sont aussi nécessaires au niveau de la compréhension des mécanismes catalytiques utilisés par les ribozymes, ainsi qu'au niveau de la reconnaissance du substrat afin d'obtenir un « design » optimal pour ces agents thérapeutiques. L'utilisation des ribozymes en tant que système modèle d'ARN constitue donc une excellente façon d'étudier ces différents aspects dans un environnement contrôlé.

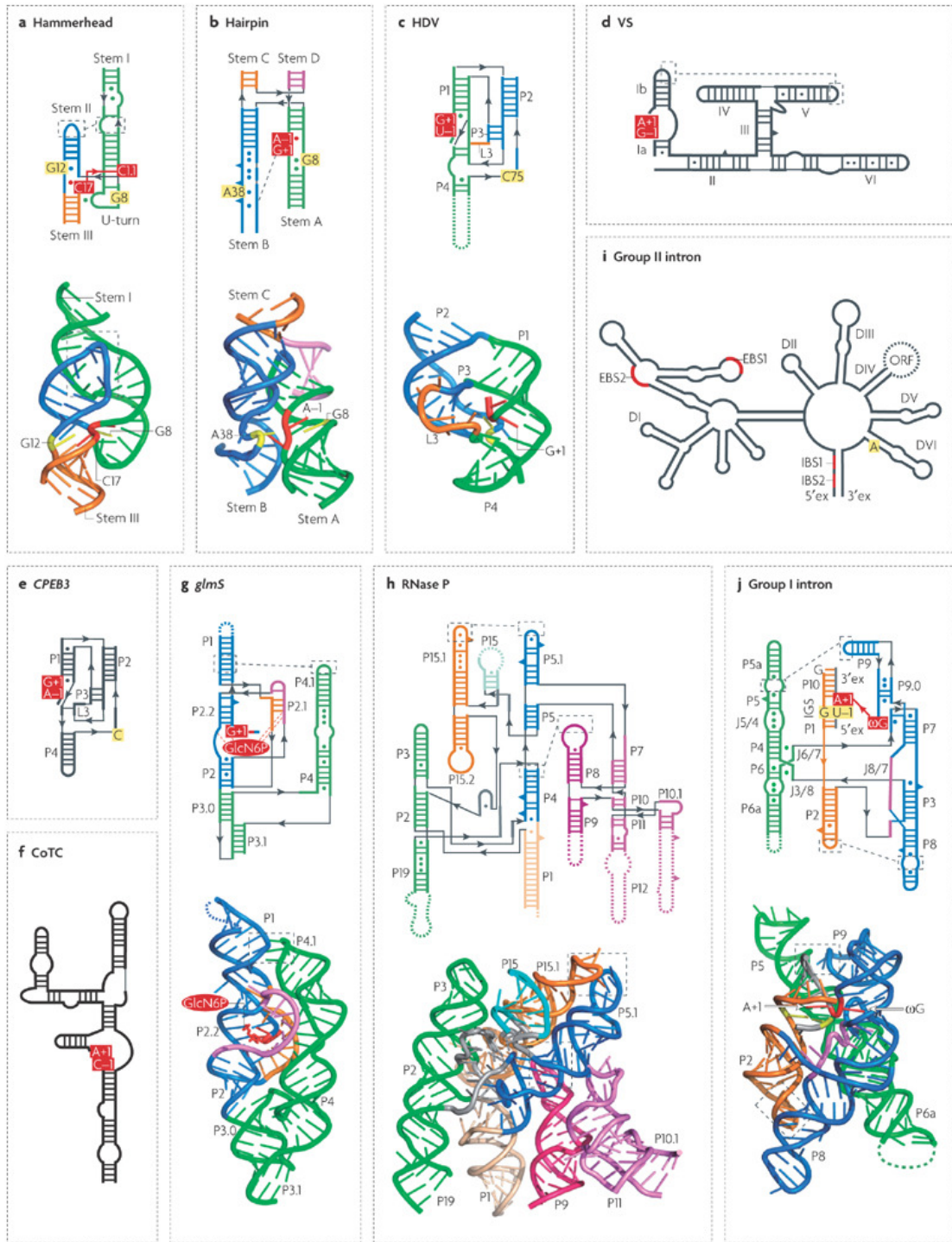
## 1.2 Les Ribozymes

### 1.2.1 Découverte des ribozymes

Les premiers ribozymes furent découverts durant les années 1980 dans les laboratoires de Thomas R. Cech. et Sydney Altman, alors qu'ils étudiaient respectivement l'épissage de l'ARN<sub>t</sub> chez le protozoaire *Tetrahymena thermophila*, et le complexe bactérien de l'ARNase P. En 1989, ils reçurent ensemble le prix Nobel de Chimie pour leur découverte des propriétés catalytiques de l'ARN. Avant cette trouvaille, toutes les enzymes étaient par défaut des protéines. Cette découverte a démontré que malgré la présence de seulement 4

bases azotées relativement similaires, il est possible d'obtenir une structure tridimensionnelle précise qui confère une activité spécifique aux ribozymes, comme dans le cas des protéines. Depuis, d'autres ribozymes naturels ont été découverts, comme le ribosome avec son activité aminoacyltransférase (Alifano, Rivellini et al. 1994). Il existe aussi une panoplie de ribozymes artificiels, qui permettent d'effectuer des réactions catalytiques non conventionnelles comme la réaction de Diels-Alder (Tarasow, Tarasow et al. 1997; Seelig and Jaschke 1999; Keiper, Bebenroth et al. 2004) et l'addition de Michael (Sengle, Eisenfuhr et al. 2001). Ces ribozymes ont été développés principalement pour prouver l'hypothèse du monde de l'ARN et pour augmenter les usages possibles de ribozymes à des fins thérapeutiques. Bien que les ribozymes décrits ci-dessus possèdent une activité catalytique comparable à celle des protéines, ils sont généralement moins efficaces. Il est donc fréquent que ces ARNs servent d'échaffaudage et s'associent à des protéines *in vivo* afin d'accélérer leur vitesse de réaction.

La plupart des ribozymes naturels, à l'exclusion du ribosome, catalysent les mêmes réactions chimiques, soit le clivage et la ligation d'ARNs. Ils sont par contre divisés en deux catégories selon leur fonction principale. La première catégorie est composée de tous les ribozymes qui s'autoclivent, ainsi que ceux qui effectuent le clivage en *trans* d'un lien phosphodiester, soit lorsque le substrat est séparé du reste du ribozyme. Cette catégorie inclut donc le « hammerhead », le « hairpin », le ribozyme VS de *Neurospora*, le virus de l'hépatite D (VHD), le glmS, le CoTC et le CPEB3 (Serganov and Patel 2007). La deuxième catégorie comprend les ribozymes qui effectuent l'épissage des ARNs, donc les introns du groupe I et II. D'autres ribozymes naturels comme le ribosome et l'ARNase P ont des fonctions biologiques importantes, soit la synthèse peptidique et la maturation des ARN<sub>t</sub>. Étant donné que les ribozymes représentent des molécules avec un potentiel thérapeutique intéressant, beaucoup d'études sont en cours pour mieux caractériser leurs structures, fonctions et mécanismes de clivage. À ce jour, la structure tridimensionnelle entière ou partielle de la plupart des ribozymes a été déterminée (figure 1), ce qui aide à mieux comprendre leur fonctionnement.



**Figure 1 : Structures secondaires et tertiaires des ribozymes naturels connus à ce jour.** Les structures secondaires des différents ribozymes sont dessinées en lignes pleines et connectées par des flèches. Les paires de bases Watson-Crick, ainsi que les non-canoniques sont représentées respectivement par des lignes solides et des cercles. Les nucléotides « bulged out » sont montrés par des triangles. Les lignes pointillées noires indiquent des



interactions tertiaires importantes. Les ribozymes qui ont une structure tridimensionnelle connue sont colorés en fonction de leurs domaines et de leur structure secondaire. Les nucléotides adjacents au site de clivage sont indiqués par une **boîte rouge** alors que ceux qui sont impliqués dans la catalyse sont indiqués par des boîtes jaunes. Les lignes pointillées colorées représentent des éléments qui sont manquants dans la structure ou qui sont substitués par des séquences non-naturelles. **a** Le ribozyme « hammerhead » **b** Le ribozyme « hairpin » **c** Le ribozyme de l'hépatite  $\delta$  **d** Le ribozyme VS de *Neurospora* **e** Le ribozyme CPEB3 **f** Le ribozyme humain CoTC **g** Le ribozyme glmS de *Bacillus anthracis* **h** L'ARNase P de *Bacillus subtilis*, type B **i** L'intron du groupe II **j** L'intron du groupe I BH72 de *Asoarcus spp.* © (2007) Nature Publishing Group (Serganov and Patel 2007).

La plupart des ribozymes de grande taille requièrent des ions divalents pour effectuer leur réaction de clivage. Ce sont donc des métalloenzymes. Cependant, la majorité des ribozymes de petite taille peuvent fonctionner sans ions divalents, ce qui soulève beaucoup de questions sur la nature et le fonctionnement de ces enzymes.

### 1.2.2 Des métalloenzymes?

Les métalloenzymes sont une classe d'enzyme, dans laquelle un ou plusieurs ions métalliques, comme le nickel, le fer, ou le magnésium, sont liés au site actif et jouent un rôle structural important. La présence d'ions métalliques est requise pour que ces enzymes accomplissent leurs fonctions biologiques. Auparavant, cette classe contenait uniquement des protéines. Depuis la découverte des ARNs catalytiques, certains ribozymes font aussi partie de cette classe d'enzyme, comme l'intron du groupe I et le leadzyme.

Initialement, il a été proposé que tous les ribozymes étaient des métalloenzymes requérant, soit du magnésium ou d'autres métaux divalents, pour obtenir un repliement adéquat et pour avoir une activité catalytique. Basé sur les études de l'intron du groupe I, un mécanisme contenant deux ions de magnésium hydratés a été proposé (Steitz and Steitz 1993) comme mécanisme général pour tous les ribozymes. Dans ce mécanisme, les deux ions servent d'acide et de base générales afin d'activer la réaction catalytique. Éventuellement, il a été démontré que ce mécanisme s'applique spécifiquement à l'intron du groupe I et non pas à tous les ribozymes (Stahley and Strobel 2005). Il semblerait en effet que la plupart des ribozymes, à l'instar des protéines, utilisent un mécanisme de catalyse par acide/base générale. Dans le cas des ribozymes de petite taille, il arrive que l'ARN ne serve

pas seulement d'échaffaudage pour lier des ions métalliques. L'ARN devient alors un participant actif dans la catalyse à l'aide de groupements fonctionnels situés sur les bases. Les nucléotides impliqués miment alors le rôle des acides aminés dans le site actif des protéines, ce qui permet une catalyse par l'ARN à partir de nucléobases. À ce jour, plusieurs ribozymes font partie de cette catégorie dont le « hammerhead, » le « hairpin » et le ribozyme VS. Quant au ribosome, qui possède une activité aminoacyltransférase, aucune étude n'a encore démontré la présence d'un ion divalent dans son site actif (Scott 2007).

### 1.2.3 Le monde de l'ARN

L'hypothèse du monde de l'ARN a été émise pour la première fois en 1967 par Carl Woese (Woese 1967), mais elle est devenue connue sous ce nom en 1986 grâce au Prix Nobel de chimie, Walter Gilbert (Gilbert 1986). Cette théorie propose, qu'à l'origine, le monde était composé uniquement d'ARN : le génome, ainsi que les enzymes en étaient entièrement composés (Crick 1968; Orgel 1968; Woese 2001). Par la suite, ce monde aurait évolué pour être composé d'ADN et de protéines. Selon cette théorie, l'ARN a donc été remplacé par l'ADN comme mode de conservation de l'information, car bien que ces deux molécules soient très similaires, l'ADN est beaucoup plus stable que l'ARN. La présence d'un groupe hydroxyl en 2' dans l'ARN permet d'attaquer et d'initier une réaction de clivage des liens phosphodiester lorsque l'ARN est dans une région simple brin. Le groupe desoxy en position 2' dans l'ADN ne permet pas ce type de réaction, ce qui donne une stabilité accrue aux chaînes d'ADN. Toujours selon cette théorie, les protéines auraient aussi remplacées l'ARN en tant qu'enzymes, puisque la présence de 20 acides aminés différents offre une plus grande diversité et flexibilité pour effectuer les mêmes réactions. L'ajout des protéines, suite à une pression évolutive, permettrait donc d'effectuer des réactions catalytiques avec une plus grande sélectivité et de façon plus efficace.

À ce jour, il a été démontré que l'ARN peut être un porteur d'information, comme l'ADN, et qu'il peut catalyser des réactions chimiques, comme les protéines. L'hypothèse du monde de l'ARN est donc supportée par les propriétés versatiles de l'ARN, mais elle reste impossible à confirmer pour le moment.

Depuis quelques années, différents groupes de recherche tentent de reproduire *in vitro* un système composé uniquement d'ARN dans le but d'appuyer cette théorie. Pour créer un tel système, la présence de trois éléments distincts est requise (Muller 2006). Premièrement, il est nécessaire d'avoir des enzymes et une polymérase qui permettent de synthétiser les nucléotides nécessaires et de polymériser l'ARN avec une haute fidélité. L'existence de ce type d'enzymes (Unrau and Bartel 1998; Lau, Cadieux et al. 2004) et de polymérase a été démontrée, mais elles ne sont pas assez efficaces pour supporter pleinement cette théorie (Johnston, Unrau et al. 2001). Des travaux sont donc en cour pour approfondir cet aspect de la théorie du monde de l'ARN. Deuxièmement, il faut un système de compartimentation pour incorporer les améliorations évolutives et finalement, il est crucial d'avoir des ribozymes qui peuvent catalyser les différentes réactions métaboliques de bases de façon efficace. La découverte des ribozymes est un des éléments clefs qui soutient cette théorie et vient combler un des chaînons manquants. Bien qu'il reste beaucoup de travaux à faire pour soutenir cette hypothèse, tout semble indiquer à ce point que l'ARN présent dans les cellules actuelles serait un vestige du passé.

Bien que certains ARNs soient un vestige du passé, cela ne veut pas dire qu'il n'est plus utile de les étudier. Au contraire, ils sont d'autant plus importants puisqu'ils sont encore présents et impliqués dans la plupart des mécanismes cellulaires et dans la synthèse peptidique. Il est donc essentiel d'augmenter notre savoir fondamental sur les propriétés des ARNs, afin de mieux comprendre les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. L'utilisation de ribozymes, comme le VS de *Neurospora*, en tant que système modèle est une excellente méthode pour approfondir nos connaissances sur l'ARN en général.

### 1.3 Le Ribozyme VS de *Neurospora*

#### 1.3.1 Description du ribozyme VS de *Neurospora*

Le ribozyme VS a été découvert en 1990 dans le laboratoire de Richard A. Collins. Il provient d'un ARN satellite de 881 nt qui est présent dans la mitochondrie de la souche Varkud-1c de *Neurospora* (Saville and Collins 1990). À ce jour, le seul rôle biologique connu pour cet ARN est la propagation de son ADN satellite (Kennell, Saville et al. 1995). Lors de sa réplication, l'ADN VS double brin est transcrit par la polymérase à ARN<sub>mt</sub>. La transcription s'effectue par un mécanisme similaire au « rolling circle » et produit des ARNs en multimères. L'ARN VS s'autoclive durant ce processus de réplication pour séparer les monomères d'ARNs VS qui sont un à la suite de l'autre. Subséquemment, l'ARN effectue une réaction de ligation avec lui-même pour obtenir un ARN simple brin circulaire. Cet ARN circularisé est ensuite retranscrit inversement par le Retroplasmide RT afin d'obtenir l'ADNc initial. Le ribozyme VS possède donc des activités de clivage et de ligation qui sont essentielles pour son autoréplication dans le champignon de *Neurospora* (Saville and Collins 1991; Jones, Ryder et al. 2001).

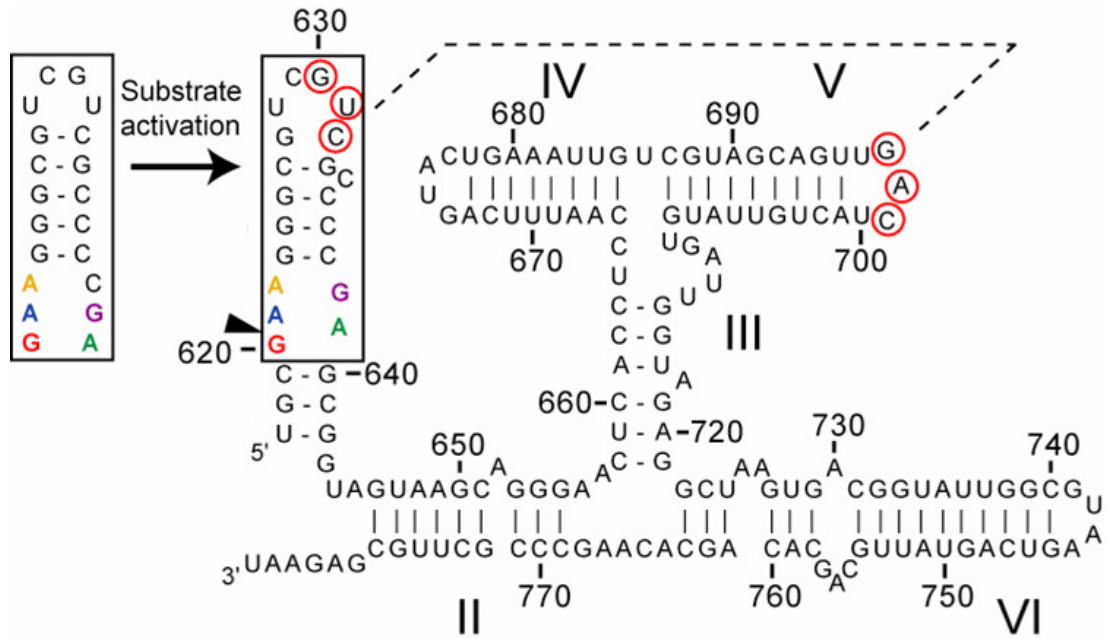
Dans le cadre de nos recherches sur la structure de l'ARN, il est avantageux d'utiliser ce ribozyme pour des études fondamentales. En effet, le ribozyme VS est un excellent système modèle pour étudier les différentes propriétés des ARNs catalytiques. Il est aussi employé pour mieux comprendre les motifs structuraux, la formation d'interactions tertiaires, le rôle des ions métalliques, ainsi que les changements conformationnels dans l'ARN. Le ribozyme VS est donc un système modèle de choix pour étudier la relation entre la structure et la fonction chez les ARNs en général.

#### 1.3.2 Structures secondaire et tertiaire

Bien que le ribozyme VS ne fasse que 881 nt, il est difficile d'utiliser un ARN de cette taille pour effectuer la majorité des études structurales. Dans la plupart des ribozymes, le fragment nécessaire à l'activité catalytique constitue seulement une courte partie de la

séquence originale (Ruffner, Dahm et al. 1989; Thill, Blumenfeld et al. 1991). Il faut cependant être prudent avec cette technique, car en abrégant la séquence de ces ribozymes, il arrive que la structure tridimensionnelle soit modifiée, ce qui peut mener à de fausses conclusions. C'est entre autres le cas du « hammerhead », où la controverse a duré plus d'une décennie entre les données biochimiques et la structure cristallographique obtenue avec la séquence minimale (Scott 2007). Cette controverse vient d'être résolue grâce à la publication de la structure cristallographique contenant la séquence complète du ribozyme « hammerhead » (Martick and Scott 2006). Il faut donc garder en tête qu'en réduisant la taille de la séquence originale, il est possible que certaines interactions tertiaires soient éliminées, ce qui peut altérer la structure des ARNs de façon significative. Il est donc nécessaire de trouver la séquence minimale des ARNs tout en conservant l'activité catalytique, et ce, sans changer la structure tridimensionnelle.

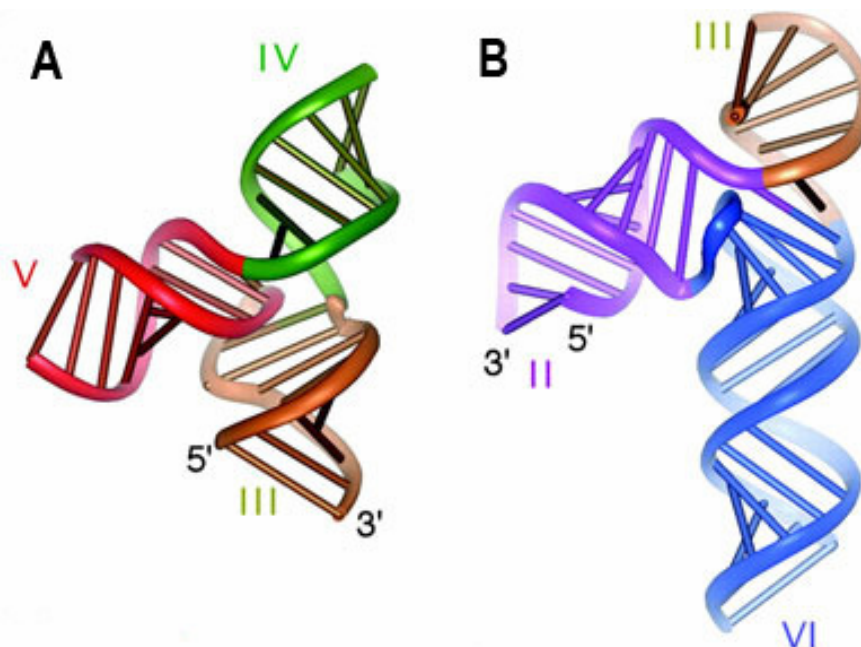
La séquence minimale du ribozyme VS, qui contient environ 154 nt, a été déterminée par des études de délétions et de mutagenèse dirigée (Guo, De Abreu et al. 1993). À l'instar du VHD, le ribozyme VS requiert seulement un nucléotide en amont du site de clivage, ce qui le différencie des autres ribozymes comme le « hairpin » et le « hammerhead ». La structure secondaire de ce fragment catalytique minimal a été déterminée subséquemment par des études de mutagenèse dirigée et par l'analyse de modifications chimiques de la structure (Beattie, Olive et al. 1995). Suite à ces études, il a été établi que le fragment minimal pour le clivage contient six domaines hélicaux où la tige-boucle I forme le substrat et les tiges-boucles II à VI forment le domaine catalytique (figure 2).



**Figure 2 : Structures primaire et secondaire du fragment responsable de l'activité enzymatique du ribozyme VS de *Neurospora*.** Les nucléotides encerclés en rouges interagissent pour former une interaction tertiaire boucle-boucle. Les tiges encadrées montrent le changement conformationnel qui prend place lors de la reconnaissance du substrat. Les nucléotides colorés forment la boucle interne où le clivage a lieu et le site de clivage est indiqué par la flèche noire. (Modifiée à partir de (Rastogi, Beattie et al. 1996) et (Andersen and Collins 2000)) © (2000) Elsevier

En présence d'ions divalents comme le calcium, le magnésium et le manganèse, le ribozyme VS adopte un repliement tertiaire spécifique qui permet, selon les conditions, le clivage et la ligation du substrat (Saville and Collins 1991). Le substrat est reconnu, entre autres, par la formation d'une interaction tertiaire entre la tige-boucle I (substrat) et la tige-boucle V (Rastogi, Beattie et al. 1996). Les nucléotides G630, U631 et C632 interagissent avec les nt G697, A698 et C699 pour former trois paires de bases Watson-Crick. La formation de cette interaction implique aussi un changement conformationnel dans le substrat (figure 2), où G623, G624 et G625, qui étaient initialement pairés avec C636, C635 et C634, changent de partenaires pour former des paires de bases avec les cytosines adjacentes; C634 devient alors non pairé. Ce changement de conformation implique aussi un réarrangement de la boucle contenant le site de clivage : elle devient asymétrique et passe de 6 à 5 nucléotides. Une fois la boucle interne réarrangée, il y a création d'un site de liaison au magnésium spécifique à la conformation active et d'un motif « shared sheared GA » (Hoffmann, Mitchell et

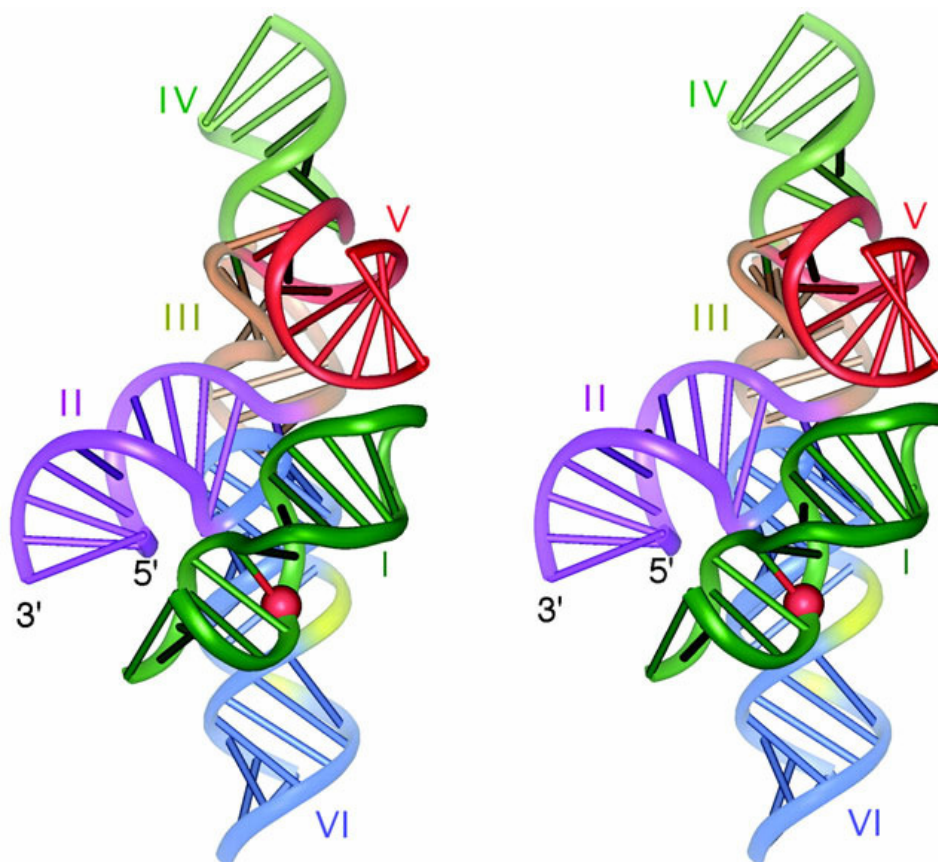
al. 2003). Dans ce motif, le G638 est partagé avec les A621 et 622 pour former deux paires de bases « sheared GA ». Suite à la reconnaissance du substrat et aux changements conformationnels, le substrat est clivé entre les nucléotides G620 et A621 par une réaction de transestérification. Bien que plusieurs ribozymes effectuent une réaction de transestérification similaire à celle du VS, celui-ci est fondamentalement différent des autres ribozymes parce qu'il reconnaît son substrat en formant des interactions tertiaires et non secondaires.



**Figure 3 : Structures tridimensionnelles des deux jonctions 3-voies dans le ribozyme VS.** (A) Structure de la jonction 3-4-5. La géométrie de cette jonction a été modélisée suite à des études comparatives sur gel électrophorèse et des expériences de FRET. © (2002) Nature Publishing Group (Lafontaine, Norman et al. 2002) (B) Structure de la jonction 2-3-6. La structure de cette jonction a été modélisée suite à des expériences de FRET et à la comparaison de la jonction 5-6-7 de la sous-unité 23S de l'ARNr. © (2001) Nature Publishing Group (Lafontaine, Norman et al. 2001)

Le bon repliement du ribozyme est nécessaire pour que l'activité catalytique prenne place. En présence de magnésium, les cinq domaines hélicaux composant le domaine catalytique forment deux jonctions 3 voies, ce qui induit une forme générale en H (figure 2) (Beattie, Olive et al. 1995). Des études comparatives par gels d'électrophorèse, ainsi que des études de FRET subséquentes ont permis de mieux caractériser la fonction de ces jonctions de façon indépendante (figure 3 : A et B) (Lafontaine, Norman et al. 2001; Lafontaine, Norman

et al. 2002). Ces deux structures ont ensuite été modélisées avec la structure RMN du substrat (Flinders and Dieckmann 2001) pour obtenir un modèle à basse résolution du ribozyme VS de *Neurospora* (figure 4). Les deux jonctions 3-voies sont dénommées jonction 2-3-6, pour celle qui connecte les hélices II, III et VI, et jonction 3-4-5 pour celle qui relie les hélices III, IV, V. Elles sont connectées par l'hélice III qui est commune à ces deux motifs structuraux. Par ailleurs, ces deux jonctions ont une fonction structurale très importante, car elles permettent d'organiser le ribozyme et d'orienter les différentes hélices l'une par rapport à l'autre afin d'optimiser la catalyse (Lilley 2004).



**Figure 4 : Vue stéréo de la modélisation à basse résolution du fragment actif dans le ribozyme VS.** La structure du domaine catalytique a été modélisée à l'aide d'études comparatives sur gel électrophorèse et d'expériences de FRET, alors que le substrat provient de la structure RMN obtenue par (Flinders and Dieckmann 2001). Il a été inséré dans la crevasse formée par les hélices II et VI de façon à ce que la jonction ouverte soit orientée pour connecter avec la fin de l'hélice II. La couleur rouge dans le substrat indique le site de clivage et la partie jaune dans l'hélice VI représente le site actif. © (2004) RNA Society (Lilley 2004)



La jonction 3-4-5 qui relie les hélices III, IV et V joue un rôle prépondérant dans l'organisation du ribozyme VS, ainsi qu'au niveau de la reconnaissance du substrat. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la longueur de l'hélice III est très importante, mais pas la séquence (Lafontaine, Norman et al. 2002). En effet, l'ajout ou l'élimination de paires de bases affecte significativement l'activité catalytique du ribozyme. Il est donc possible que cette modification de la tige III cause une variation de l'angle dièdre et fait en sorte que le substrat interagisse moins bien avec le ribozyme. Quant à la tige-boucle IV, elle peut être raccourcie de façon significative sans affecter l'activité catalytique. Sa fonction principale semble de stabiliser la formation de la jonction 3-4-5. Pour ce qui est de l'hélice V, elle contient 9 pb qui sont importantes pour l'activité catalytique et la reconnaissance du substrat. L'identité des nucléotides n'est pas importante, du moment que les 9 pb sont formées. L'ajout ou la délétion de paires de bases modifie la longueur de la tige et induit une torsion dans cette hélice, ce qui nuit probablement à la formation de l'interaction tertiaire avec la tige-boucle I (Lafontaine, Norman et al. 2002). Les nucléotides qui sont généralement non pairés dans la jonction sont aussi importants. Ils possèdent différents rôles structuraux pour faciliter la formation de la jonction. Ils forment, entre autres, un motif U-turn dans la jonction qui permet de stabiliser les différentes hélices (Sood and Collins 2001). Ce type de motif est retrouvé relativement fréquemment dans l'ARN.

Les études de FRET permettent généralement d'observer et de quantifier les changements conformationnels chez différentes molécules. Cette technique consiste à ajouter deux molécules fluorescentes (un accepteur et un donneur) aux extrémités d'une molécule biologique d'intérêt et à observer le transfert d'énergie entre les deux fluorophores. L'efficacité du transfert d'énergie dans le FRET est inversement proportionnelle à la puissance six de la distance (Stryer and Haugland 1967), ce qui permet d'évaluer la variation de la distance entre ces deux fluorophores de façon quantitative. Des études utilisant cette technique ont donc démontré qu'en absence d'ions divalents, la jonction 3-4-5 est dans une conformation étendue non-repliée. Lors de l'ajout de magnésium, cette jonction adopte un repliement tertiaire où les hélices III et IV sont empilées de façon co-axiale (Lafontaine, Norman et al. 2002). Cet empilement induit la présence d'un angle aigu entre les hélices III et V (figures 3 (A) et 4) qui est nécessaire pour la reconnaissance du substrat. Bref, la géométrie de la jonction 3-4-5

permet de bien orienter l'hélice V afin qu'elle puisse interagir avec le substrat et former une interaction boucle-boucle stable.

Quant à la jonction 2-3-6 qui relie les hélices II, III et VI, elle joue un rôle majeur dans le repliement du ribozyme VS pour bien orienter le site de clivage et le substrat. Des études de mutagenèse exhaustives ont été effectuées sur les différentes hélices qui forment cette jonction afin de mieux comprendre la fonction des différents segments (Lafontaine, Wilson et al. 2001). L'élément dominant dans l'hélice II est le nucléotide A652 qui est « bulged out ». L'identité de ce nucléotide n'est pas importante, mais le brin sur lequel il est situé, ainsi que le nombre de paires de bases qui le séparent de la jonction, sont critiques. Ce « bulge » semble induire une déformation locale (« kink ») dans l'hélice qui est essentielle pour l'activité catalytique du ribozyme. Pour ce qui est de l'hélice VI, la portion distale de l'hélice n'est pas nécessaire et peut même être complètement éliminée sans perturber l'activité de façon significative. Cependant, cette hélice contient deux autres nucléotides « bulged » qui sont critiques pour l'activité du VS. L'identité des deux nucléotides n'est pas vraiment importante du moment qu'ils sont non pairés avec les nucléotides attenants. Ce double « bulge » joue un rôle similaire à celui présent dans l'hélice II et induit probablement une courbe brusque (« kink ») dans l'hélice. L'absence de ce « bulge » influence sérieusement l'activité de clivage, car il affecte l'orientation du site actif. Son absence peut aussi potentiellement nuire à la formation de certaines interactions entre le site actif et les autres parties du ribozyme. L'autre élément qui est essentiel pour le clivage est la boucle interne contenant le A730. Cette boucle asymétrique contient une adénine (A730) sur un brin qui fait face à la séquence CAG sur l'autre brin. Cette boucle interne constitue le site actif du ribozyme VS.

Les études de mutagenèse décrites ci-dessus ont permis de caractériser les différents « morceaux » nécessaires pour le fonctionnement du ribozyme VS dans la jonction 2-3-6. Subséquemment, des études de FRET ont été utilisées pour caractériser le repliement de cette jonction. À l'instar de la jonction 3-4-5, la jonction 2-3-6 se replie de façon non-coopérative en présence d'ions divalents comme le magnésium (Lafontaine, Wilson et al. 2001). Les études de fluorescences (FRET) indiquent qu'elle adopte un repliement similaire lorsqu'elle est isolée ou dans le contexte du ribozyme complet (Lafontaine, Wilson et al. 2001).

La modélisation de cette jonction indique que les hélices III et VI sont empilées de façon co-axiale et qu'un angle aigu est formé entre les hélices II et IV. Suite à la formation du modèle et à l'analyse de l'orientation des différentes hélices, il est devenu évident que le substrat (hélice I) vient se loger dans la crevasse formée entre les hélices II et VI, car la position qu'il peut occuper est grandement limitée par la présence du lien covalent entre les hélices I et II dans le ribozyme actif en *cis*. Tel que montré dans le modèle global, le lien phosphate qui est coupé dans le site de clivage (tige-boucle I) est alors vraiment proche du site actif (boucle interne A730 (tige-boucle VI)). Le modèle obtenu par FRET (figure 4) est donc consistant avec l'information qui est connue à ce jour sur le ribozyme VS.

### 1.3.3 Le site actif

Afin de mieux comprendre comment fonctionne le mécanisme du ribozyme VS, plusieurs groupes ont tenté de situer et d'étudier le site actif de cet ARN catalytique. Les études de mutagenèse effectuées dans les laboratoires de Lilley et de Collins indiquent que le site actif est localisé dans la boucle interne qui contient le A730 dans l'hélice VI. Cette boucle asymétrique contient une adénine (A730) sur un brin qui fait face à la séquence C755, A756 et G757 sur l'autre brin. L'ablation de cette boucle particulière mène à une perte totale de l'activité catalytique en *cis* (Lafontaine, Wilson et al. 2001). Cette observation indique que certains nucléotides ou motifs structuraux présents dans la boucle A730 jouent un rôle important dans la réaction de clivage. Effectivement, des études de mutagenèse exhaustives ont démontré que la substitution des nucléotides présents dans cette boucle affecte le clivage de façon significative. Le nucléotide le plus sensible est cependant A756. Le remplacement de ce nucléotide par n'importe quel autre affecte significativement la catalyse du ribozyme. Ce nucléotide semble donc être très important pour la compréhension du mécanisme de clivage.

L'une des preuves les plus importantes pour la localisation du site actif provient de la formation d'un pontage chimique entre le site de clivage et la boucle A730. Un ribozyme capable de se cliver et de se liguer a été modifié pour inclure une permutation circulaire du substrat. Une 4-thio-uridine (sU), un nucléotide photoactif, a ensuite été incorporée un nucléotide en aval du site de clivage. L'exposition de cet ARN aux rayons UV a produit un

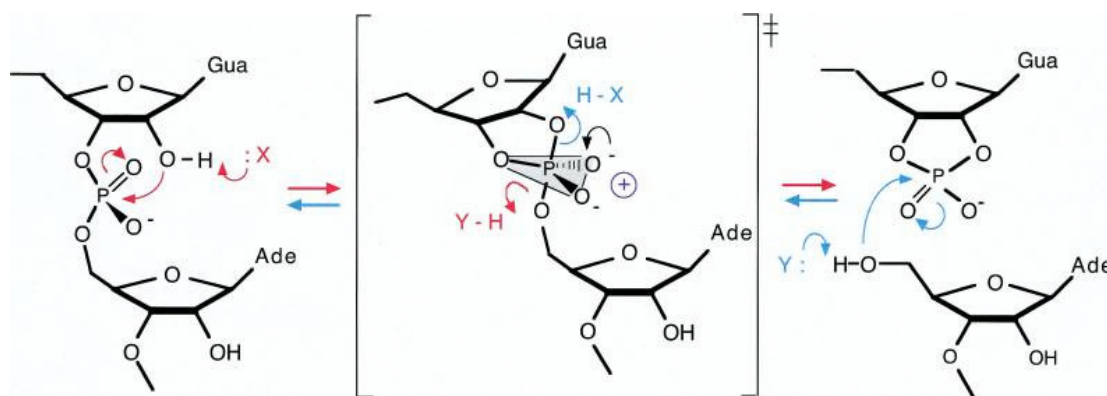
pontage entre le A756 présent dans la boucle A730 et le site de clivage (Hiley, Sood et al. 2002). Étant donné la nature du pontage et de l'uridine utilisée, l'interaction tertiaire détectée par le pontage devrait mesurer moins de 4 Å (Bravo, Woisard et al. 1999). Le A756 est donc situé à proximité du site de clivage à un certain moment dans la réaction de clivage. La présence de ce pontage est la première preuve physique qui atteste la présence du site catalytique dans l'hélice VI.

Plusieurs études, effectuées au fil des ans, sont arrivées à des conclusions qui supportent la présence du site actif dans la boucle A730. Par exemple, des études utilisant des phosphorothioates ont démontré que plusieurs phosphates dans la boucle A730 sont essentiels pour la réaction de clivage (Sood, Beattie et al. 1998). Ces études servent généralement à identifier les phosphates qui sont importants pour la réaction chimique et pour la stabilisation d'interactions tertiaires avec le reste du ribozyme. Des études utilisant le « hydroxyl radical footprinting » ont aussi permis d'identifier des régions du ribozyme qui ne sont pas accessibles au solvant en présence du substrat. Plusieurs nucléotides dans la tige-boucle II, ainsi que les nucléotides C755, A756 et G757, en font partie (Hiley and Collins 2001). Par ailleurs, il a été également démontré que le groupement 2'-OH de plusieurs nucléotides dans l'hélice II, ainsi que celui du A756 sont impliqués soit dans des interactions qui stabilisent le ribozyme ou dans le mécanisme réactionnel (Sood, Yekta et al. 2002). Tous ces résultats sont cohérents avec le fait que le substrat vient se loger dans la crevasse formée entre les hélices II et VI pour interagir, entre autres, avec le site actif, tel que proposé dans le modèle obtenu par FRET (figure 4) (Lafontaine, Norman et al. 2001).

Il est maintenant accepté que le site actif du ribozyme VS est localisé dans la boucle A730 de l'hélice. Cette conclusion est basée sur l'ensemble des preuves biochimiques et structurales obtenues à ce jour. La localisation du site actif permet désormais de s'interroger plus amplement sur les subtilités du mécanisme réactionnel et sur les groupements chimiques impliqués dans cette réaction.

## 1.3.4 Mécanisme proposé

Dans son contexte naturel, le ribozyme VS s'autoclive en *cis* par une réaction de transestérification qui produit une extrémité 5' hydroxyle libre et une extrémité contenant un phosphate-2',3' cyclique (Saville and Collins 1990). Cette réaction s'effectue aussi en *trans*, lorsque le substrat est séparé du domaine catalytique (Guo, De Abreu et al. 1993). La réaction est initiée par une attaque de l'oxygène en 2' sur le phosphore localisé en 3'. Cette attaque entraîne la formation d'un intermédiaire trigonal bipyramidal (figure 5), panneau du milieu). Il s'en suit d'une réaction de type  $S_N2$  où le groupe contenant l'oxygène en 5' part, ce qui laisse un phosphate 2',3' cyclique. La ligation se fait en inversant ce mécanisme tel que démontré dans la figure 5. Bien que les structures secondaire et tertiaire du VS soient uniques, la réaction de transestérification qu'il catalyse est similaire à celles effectuées par les ribozymes « hairpin », « hammerhead » et VHD (Beattie, Olive et al. 1995).



**Figure 5 : Mécanisme réactionnel du clivage et de la ligation du substrat par le ribozyme VS.** Dans la réaction de clivage (en rouge), le phosphore en 3' est attaqué par l'oxygène en 2'. Le départ de l'oxygène en 5' forme un phosphate 2',3' cyclique. Dans la réaction de ligation (en bleu), l'oxygène en 5' sert de nucléophile et attaque le phosphore en 3', ce qui entraîne la formation d'un lien phosphodiester internucléotide. © (2004) RNA Society (Lilley 2004).

Plusieurs études effectuées à ce jour indiquent que la réaction de clivage du ribozyme VS pourrait avoir lieu en utilisant une catalyse par acide/base générale. Cette hypothèse est supportée par des études de mutagenèse. Celles-ci ont prouvées que deux résidus sont principalement impliqués dans le mécanisme réactionnel : G638 dans le site de clivage (Wilson, McLeod et al. 2007) et A756 dans le site actif (Lafontaine, Wilson et al. 2002). Afin de mieux comprendre le rôle du A756, l'impact sur l'activité catalytique des différents groupes

présents dans cette base a été analysé de façon systématique (Lafontaine, Wilson et al. 2002). Il s'avère que l'excision du groupement hydroxyle en 2' a peu d'impact sur l'activité catalytique, mais l'ablation de la base (nucléotide abasique) la réduit drastiquement (réduction  $\geq 1000$  fois). Des modifications subséquentes ont démontré que ce sont les groupes présents sur la face Watson-Crick qui sont importants pour l'activité catalytique. Ces résultats supportent l'hypothèse que le A756 est impliqué dans le mécanisme réactionnel. Des études similaires ont récemment été effectuées sur le G638 puisqu'il semble aussi impliqué dans le mécanisme de clivage (Wilson, McLeod et al. 2007; Jaikaran, Smith et al. 2008). À l'instar du A756, le groupement hydroxyle en 2' n'est pas important pour l'activité catalytique, mais l'ablation de la base affecte sérieusement la réaction. La substitution des groupements sur la base indique que le groupe carbonyle du C6 et/ou le proton imino du N1 sont critiques pour l'activité catalytique.

L'importance critique du A756 est connue depuis plusieurs années, mais jusqu'à maintenant, il était difficile de cerner son rôle. Il a été suggéré que le A756 pourrait être impliqué dans la liaison d'un ion métallique essentiel, qu'il pourrait avoir un rôle structural très important au niveau de la boucle interne, qu'il pourrait stabiliser la formation de l'état de transition ou qu'il pourrait être impliqué dans le mécanisme réactionnel avec une catalyse par acide/base générale. La découverte d'un deuxième nucléotide essentiel pour la réaction catalytique, mais localisé dans le substrat supporte l'hypothèse du rôle dans le mécanisme réactionnel.

Le mécanisme de catalyse par acide/base générale implique que lors de la formation de l'état de transition, une base va enlever le proton sur le groupe 2'-OH pour permettre la formation d'un intermédiaire trigonal bipyramidal et qu'un acide va ensuite donner un proton à l'oxygène en 5' pour résoudre cet intermédiaire. Dans le cas où des nucléobases comme le A756 et le G638 agiraient en tant qu'acide et base générales, cela impliquerait qu'à pH neutre, des populations suffisantes de bases et d'acides protonés et déprotonés doivent être présentes pour que la réaction prenne place. Cependant, il est important de mentionner que, à l'inverse des protéines, les acides ribonucléiques ne possèdent pas de groupes fonctionnels avec des pKas qui sont proches du pH neutre. Les groupements les plus susceptibles

d'interagir dans une réaction chimique sont le N1 des adénines, le N3 des cytidines, le N1 des guanines et le N3 des uridines. Les pKas de ces atomes sont respectivement de 3.5 et 4.2 pour les adénines et les cytidines, alors que le pKa est d'environ 9.4 dans le cas des guanines et des uridines (Saenger 1984). Un mécanisme agissant par acide/base générale nécessitera donc fréquemment la présence de pKas modifiés pour que la réaction soit possible à pH physiologique.

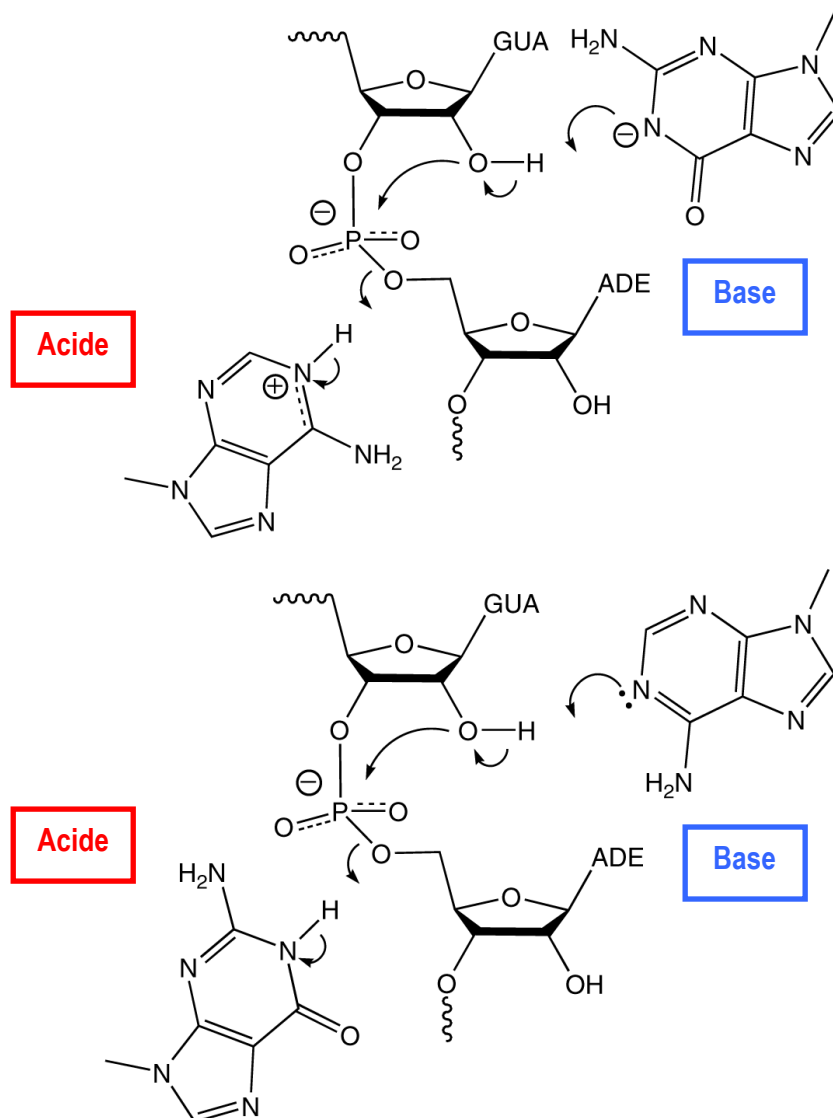
Initialement, il semblait improbable que le mécanisme catalytique procède par une catalyse acide/base générale, puisque les courbes enzymatiques ne démontraient aucune dépendance au pH (Collins and Olive 1993). Par la suite, il est devenu évident que cette absence de relation entre l'activité et le pH était due au fait que l'étape limitante dans ces études était la formation de l'interaction entre la tige-boucle I et la tige-boucle V (Rastogi, Beattie et al. 1996; Andersen and Collins 2000). L'utilisation de constructions où la formation de cette interaction tertiaire n'est pas l'étape limitante a permis d'obtenir plus d'informations sur le mécanisme du ribozyme VS (Zamel, Poon et al. 2004). En effet, des études de cinétiques ont révélé la présence de deux pKas modifiés lors de la réaction catalytique (Smith and Collins 2007). Le premier appartient à une adénine ou une cytidine ( $pK_a = 5.2 - 5.8$ ) (Jones and Strobel 2003; Smith and Collins 2007; Wilson, McLeod et al. 2007) alors que le deuxième appartient à une guanine ou une uridine ( $pK_a = 8.3 - 9.0$ ). Pour vérifier si c'est deux pKas modifiés correspondent aux nucléotides A756 et G638, ces bases ont été substituées par des analogues qui contiennent des pKas modifiés sur différents groupes fonctionnels. Ces études confirment que ces deux nucléotides essentiels ont des pKas modifiés. Selon les études de NAIM, le A756 devient ionisé lors de la réaction de ligation et le pKa minimal estimé est de 5.4 (Strobel, Jones et al. 2003). Le pKa du G638 quant à lui, semble osciller aux alentours de 8.4 (Wilson, McLeod et al. 2007). Des études récentes de cinétique et de pH utilisant des analogues de ces bases, semblent aussi indiquer que G638 joue un rôle important dans le transfert d'un proton durant l'étape limitante du clivage en cis du ribozyme VS (Jaikaran, Smith et al. 2008). L'information disponible à ce point indique donc que le A756 et le G638 jouent des rôles cruciaux dans le mécanisme de clivage.

Pour déterminer le rôle exact du A756 dans le mécanisme réactionnel, un ribozyme abasique à la position 756 a été créé et de l'imidazole a été ajouté au mélange réactionnel. Dans le cas du ribozyme VHD, où le C75 est impliqué dans la catalyse par acide/base générale, ce type de substitution a permis de récupérer l'activité catalytique. Cependant, le résultat fut négatif dans le cas du ribozyme VS (Lafontaine, Wilson et al. 2002) et il a été proposé que ce résultat est probablement dû à l'affaiblissement d'une structure précise ou à l'inaccessibilité du centre réactif par l'environnement extérieur. Cette hypothèse est aussi supportée par le fait que l'ajout d'adénine exogène ne peut rétablir l'activité du ribozyme. Ces suppositions ont été confirmées récemment par l'incorporation d'un pseudonucléotide contenant l'imidazole à la place du A756. Cette construction permet de façon spécifique le clivage et la ligation du substrat en *trans* à la position attendue (Zhao, McLeod et al. 2005). Les résultats obtenus confirment que le A756 est positionné à proximité du substrat. Étant donné que l'imidazole est un excellent catalyseur pour les réactions acide-base à pH neutre, ceci indique que le A756 agit soit comme catalyseur dans une réaction acide/base, soit comme stabilisateur de l'intermédiaire de transition. Typiquement, les structures cristallographiques ou RMN fournissent des informations qui aident à éclaircir les problèmes sur les mécanismes réactionnels. Dans le cas du ribozyme VS aucune structure du ribozyme entier n'est disponible, mais la structure d'un fragment contenant le site actif a été déterminée de façon indépendante (Flinders and Dieckmann 2004). Bien que la structure déterminée comporte un pKa modifié au niveau du résidu A756, la structure secondaire ne correspond pas avec celle établie par les études biochimiques. Par ailleurs, la plupart des données biochimiques sur le VS ne sont pas en accord avec cette structure tridimensionnelle. Il n'est donc pas utile à ce point de comparer cette structure avec le mécanisme proposé.

La proposition d'une catalyse par acide/base générale chez le ribozyme VS n'est pas surprenante puisque les bases sont souvent impliquées dans les réactions chimiques des ribozymes. On retrouve ce type de mécanisme entre autre chez le ribozyme « hairpin », le « hammerhead » et le VHD (Revus dans (Fedor and Williamson 2005)). Dans le cas du « hairpin », les bases G8 et A38 sont à proximité du lien phosphodiester qui est clivé et ces deux nucléotides forment plusieurs ponts hydrogène qui permettent de stabiliser l'intermédiaire de transition (Rupert and Ferré-D'Amaré 2001; Rupert, Massey et al. 2002). Le A38 et le G8



sont également bien placés pour agir respectivement en tant qu'acide et base générale, ce qui est consistant avec les profils de pH observés, ainsi qu'avec les études biochimiques. Les données récemment acquises sur un cristal du ribozyme « hammerhead » semblent indiquer un rôle similaire pour le G12, ce qui est aussi supporté par les études biochimiques (Martick and Scott 2006; Nelson and Uhlenbeck 2006). Dans le cas du VHD, le C75 est positionné à proximité du lien phosphodiester qui est clivé. L'ablation de cette base empêche le clivage et l'activité catalytique peut être restaurée par l'ajout d'imidazole (Perrotta, Shih et al. 1999; Shih and Been 2001). Des études récentes ont aussi établi que le C75 agit en tant qu'acide dans la réaction. Le deuxième partenaire dans cette catalyse par acide/base générale serait un ion métallique hydraté. Le mécanisme proposé pour le ribozyme VS est donc couramment utilisé par les ribozymes de petite taille.



**Figure 6 : Illustration des deux mécanismes proposés pour la réaction de clivage du ribozyme VS de *Neurospora*.** Les deux mécanismes illustrés sont basés sur la participation des résidus G638 et A756 dans un mécanisme de catalyse par acide/base générale. Dans le mécanisme du haut, la guanine agit comme base générale pour déprotoner le groupe 2'-OH alors que l'adénine agit comme acide et protone l'oxyanion en 5'. Dans le mécanisme du bas, le rôle des deux bases est inversé. Il est impossible à ce moment-ci de distinguer lequel représente la situation réelle. © (2007) Nature Publishing Group (Wilson, McLeod et al. 2007).

L'information accumulée à ce point sur le ribozyme VS a permis d'élaborer un mécanisme proposé dans lequel A756 et G638 constituent un acide et une base générales. Il est cependant impossible de déterminer en ce moment lequel constitue l'acide, et lequel constitue la base. Il existe deux mécanismes possibles (figure 6). Cette réaction serait

effectuée via une catalyse acide/base générale semblable à celle décrite pour le ribozyme « hairpin ». Non seulement le positionnement et l'orientation entre le site actif et le site de clivage sont similaires chez ces deux ribozymes, mais dans les deux cas, ils sont causés par une interaction entre deux boucles internes. La localisation du lien phosphate clivé par rapport aux bases impliquées dans le substrat et le site actif est d'ailleurs très semblable. Le ribozyme « hairpin » utilise le mécanisme du haut où la guanine agit comme base et l'adénine agit comme acide. Le mécanisme du bas (figure 6) indique le mécanisme inverse où la guanine agit comme acide et l'adénine agit en tant que base. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour établir quel mécanisme prend place dans le cas du VS.

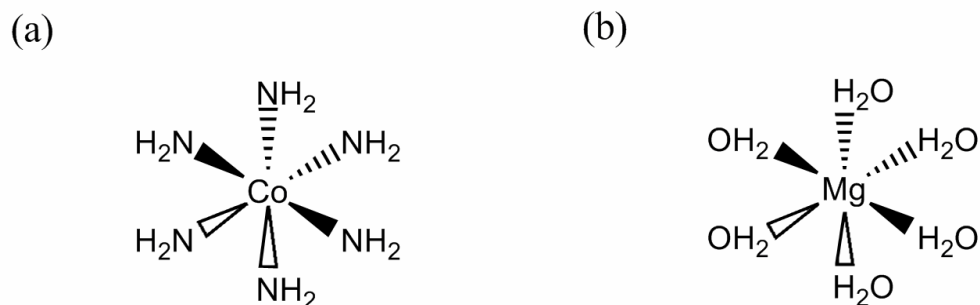
Malgré les nombreuses études effectuées à ce jour, il est encore difficile de bien comprendre le mécanisme réactionnel utilisé par le ribozyme VS. La présence d'une structure cristallographique ou RMN qui correspond à un état actif serait particulièrement utile pour mieux saisir les subtilités de ce mécanisme.

### 1.3.5 Rôle des ions métalliques

La dernière question en suspens est le rôle des ions métalliques dans le mécanisme catalytique du ribozyme VS. Il faut premièrement considérer le fait que l'ARN contient un groupement phosphate pour chaque base présente. Ceci en fait une molécule qui est hautement chargée négativement (polyanionique). À la base, des ions métalliques monovalents et/ou divalents sont nécessaires pour obtenir un repliement de l'ARN et donc formation des structures secondaires et tertiaires. Ces ions métalliques s'associent faiblement avec le squelette de riboses et de phosphates pour former des interactions non-spécifiques qui neutralisent les charges négatives. Il ne faut cependant pas oublier que les ions divalents et monovalents peuvent aussi s'associer de façon spécifique à l'ARN, soit pour des raisons structurales ou pour participer au mécanisme de clivage.

Initialement, il a été démontré que la réaction de clivage du VS était fortement stimulée par la présence d'ions divalents comme le magnésium, le manganèse et le calcium. Le magnésium semble cependant plus efficace (Collins and Olive 1993). Il a donc été proposé

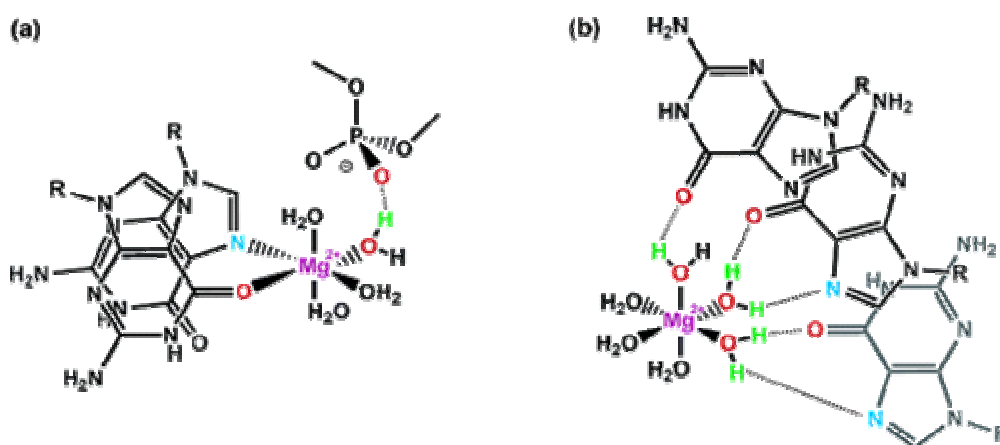
que le magnésium pourrait jouer un rôle direct dans l'activité de ce ribozyme. Par contre, des études subséquentes ont démontré que la réaction de clivage peut avoir lieu, sans ions divalents, en présence de très hautes concentrations ( $\sim 1-4$  M) d'ions monovalents comme le sodium et le lithium, ainsi qu'en présence d'ions ammonium (Murray, Seyhan et al. 1998). Considérant qu'il faut des concentrations d'ions monovalents dans l'ordre du molaire pour obtenir le même effet qu'avec 5 à 20 mM de magnésium, les forces ioniques impliquées sont complètement différentes. Il est donc fort probable qu'à une certaine concentration, les ions monovalents vont occuper et agir comme substitut(s) dans un site normalement spécifique pour le magnésium (Sigel and Pyle 2007). Il est donc impossible de conclure seulement avec ces études que les ions magnésium ne sont pas impliqués dans le mécanisme réactionnel du VS.



**Figure 7 : Représentation chimique du cobalt hexammine et du magnésium hexahydraté.** (a) Molécule de cobalt hexammine. (b) Magnésium hexahydraté.

Afin d'examiner en profondeur le rôle des ions divalents chez le ribozyme VS, des études utilisant le cobalt hexammine ont été effectuées. Cet ion est un analogue structural du magnésium hexahydraté (figure 7) et il interagit avec l'ARN de manière similaire en faisant une interaction de type « outer-sphere » (Draper 1996; Nixon, Theimer et al. 1999). À l'inverse des molécules d'eau liées au magnésium, les groupements amines liés au cobalt hexammine ne peuvent pas se détacher facilement du cobalt. La liaison entre l'ARN et cet ion ne peut donc pas se faire par coordination « inner-sphere », mais uniquement par « outer-sphere » (Cowan 1993).

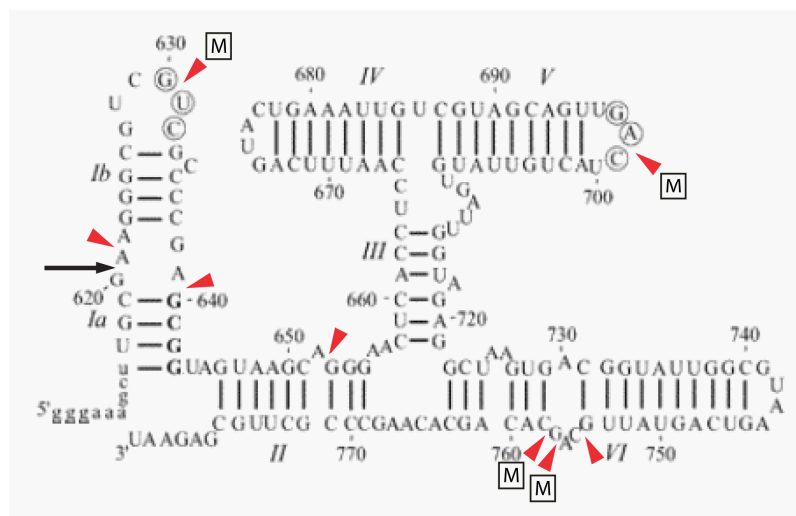
En présence de cobalt hexammine, le ribozyme VS n'est pas actif (Maguire and Collins 2001). L'ajout de faibles quantités de magnésium au ribozyme replié par le cobalt hexammine permet cependant de restaurer l'activité catalytique. Ceci indique que, comme démontré par l'analyse des modifications chimiques, le cobalt hexammine permet un repliement de l'ARN qui supporte la catalyse. Cependant, il y a un ou plusieurs sites de liaison du magnésium qui interagissent par coordination « inner-sphere » (figure 8). Au moins un de ces sites est essentiel soit pour le réarrangement du substrat, la formation d'interactions tertiaires ou l'activité catalytique du ribozyme VS.



**Figure 8 : « Inner et outer binding sphere » du magnésium dans l'ARN.** (a) Exemple typique de la liaison d'un ion magnésium à l'ARN. Il est coordonné directement au N7 et au groupe carboxyle de deux guanines (« inner-sphere coordination »), ainsi qu'à un groupement phosphate via une molécule d'eau (« outer-sphere coordination »). (b) Exemple typique de « outer-sphere coordination » par un ion magnésium. Celui-ci est lié à l'ARN par l'intermédiaire de molécules d'eau (« outer-sphere coordination »). Les atomes impliqués dans la coordination du magnésium sont indiqués en couleur. © (2007) American Chemical Society (Sigel and Pyle 2007).

Dans le but d'identifier les ions magnésium qui interagissent avec des groupements phosphates dans le VS, des substitutions avec des phosphorothioates ont été réalisées. Dans cette technique, l'oxygène Rp des différents groupements phosphates est remplacé par un atome de soufre lors de la transcription (Griffiths, Potter et al. 1987). La présence de ce soufre interfère avec la capacité du magnésium à se lier aux sites de liaison, car le magnésium a 30 000 fois moins d'affinité pour le soufre que pour l'oxygène (Jaffe and Cohn 1979; Pecoraro, Hermes et al. 1984). L'activité des sites critiques peut ensuite être récupérée

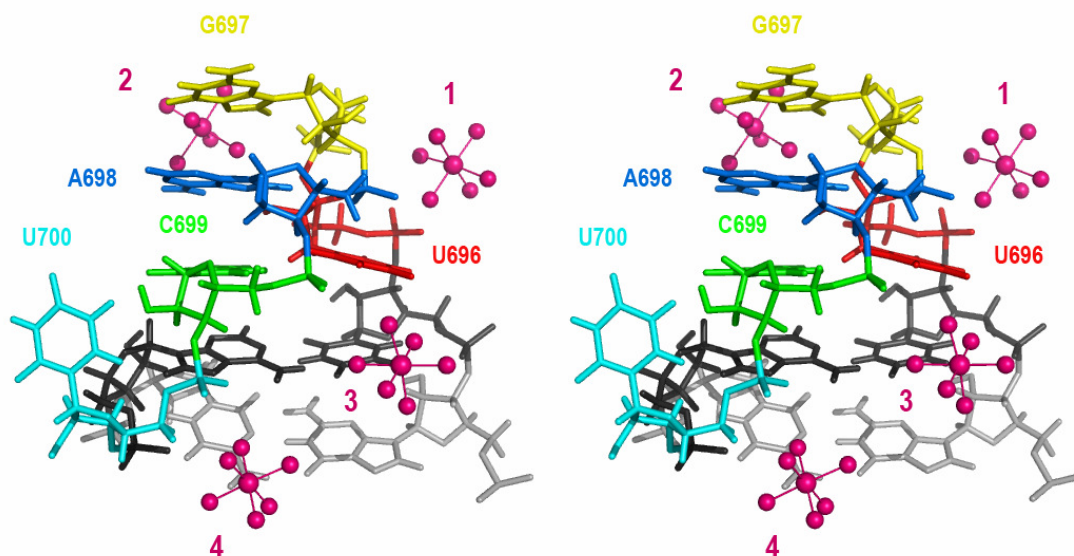
par l'ajout de manganèse, puisque cet atome a autant d'affinité pour le soufre que pour l'oxygène (Dahm, Derrick et al. 1993; Lindqvist, Sandstrom et al. 2001). Cette technique est donc utile pour observer les contacts directs entre les phosphates et le magnésium. La plupart des phosphates qui lient le magnésium sont situés dans l'interaction boucle-boucle, le site de clivage et le site actif (Sood, Beattie et al. 1998) (figure 9).



**Figure 9 : Résumé des phosphates dans le ribozyme VS qui sont sensibles aux substitutions par des phosphorothioates.** Les flèches rouges indiquent les phosphorothioates qui ont un effet inhibiteur sur la réaction catalytique du VS. La présence d'un M dans un carré à côté des flèches signifie que l'activité peut être récupérée lors de l'ajout de manganèse. Le site de clivage est indiqué par une flèche noire.

Au niveau de l'interaction boucle-boucle, les phosphates des résidus U631 et C699 sont impliqués dans la liaison du magnésium. Ces deux phosphates peuvent donc lier un ou plusieurs ions magnésium. La structure de la tige-boucle V en présence de magnésium, ainsi que les sites de liaison du magnésium contenus dans cet ARN, ont été déterminés récemment par RMN (Campbell, Bouchard et al. 2006). Ceci permet donc de comparer les sites de liaison du magnésium identifiés par deux techniques différentes. Quatre sites de liaisons spécifiques au magnésium ont été identifiés en utilisant des études paramagnétiques et du cobalt hexammine. Le site identifié par les études de phosphorothioates est présent dans la structure RMN (figure 10, site 3). Cependant, trois autres sites distincts ont été découverts par le biais de la RMN. Le site 2 ne liant aucun phosphate, il est normal qu'il n'ait pas été détecté. Néanmoins, les sites 1 et 4 stabilisent certains phosphates et ils n'ont pas été identifiés par ces études biochimiques. Cette omission s'explique par le fait que, dans les études de

phosphorothioates, en moyenne un seul phosphate est modifié par molécule. Il est donc fort possible que la rupture d'un seul contact ne soit pas suffisante pour empêcher la liaison du magnésium, ce qui préviendrait sa détection. Bien que cette technique soit utile pour trouver les sites de liaison des métaux divalents, elle n'est pas suffisante pour tous les identifier, d'où l'importance d'utiliser plusieurs méthodes pour obtenir des informations complémentaires.



**Figure 10 : Localisation des sites de liaison aux ions divalents dans la tige-boucle V.** Vue stéréo de la structure moyenne de la tige-boucle V. Les complexes  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  sont identifiés en rose par des chiffres de 1 à 4.

Quant au site de clivage, il contient deux résidus dont les phosphates lient le magnésium selon les études de phosphorothioates : A622 et G640. Trois structures du site de clivage, contenant des séquences légèrement différentes, ont été résolues par RMN (Michiels, Schouten et al. 2000; Flinders and Dieckmann 2001; Hoffmann, Mitchell et al. 2003). Dans les deux premiers cas, il a été établi que la structure résolue ne correspond pas à une conformation active du substrat. Il a ensuite été établi que la troisième structure représente l'état actif du site de clivage (Hoffmann, Mitchell et al. 2003). Dans cette structure deux sites de liaison du magnésium sont présents, dont un qui est présent seulement dans la conformation active. Le premier site est situé à proximité des résidus C619, G620, A639 et G640. Étant donné que cet ion est présent dans les conformations actives et inactives, il est probablement important au niveau structural. Le deuxième site, qui est présent seulement

dans la conformation active, est situé à proximité des résidus A622 et G623. Cet ion est alors situé proche du lien phosphate qui est clivé lors de la réaction de transestérification. La localisation de ces deux sites concorde donc avec les études de phosphorothioates mentionnées précédemment. Les études de mutagenèses indiquent aussi que la présence du deuxième magnésium est essentielle pour l'activité catalytique (Sood, Beattie et al. 1998). Il est donc fort probable qu'il soit impliqué dans le mécanisme réactionnel, ou qu'il serve à contrebalancer le développement de charges négatives lors de la formation d'interactions tertiaires avec le reste du ribozyme ou lors de la formation d'un intermédiaire durant la réaction de clivage.

Le dernier groupe de phosphates affectés par le magnésium est localisé dans le site actif, soit dans la boucle interne contenant le A730. Les nucléotides principalement affectés par la présence de phosphorothioates sont C755, G757 et C758. Cependant, l'inhibition détectée au C755 ne peut pas être éliminée par l'ajout de manganèse. Le remplacement du phosphate par un soufre semble donc modifier la géométrie du lien, ce qui affecte sérieusement la catalyse. Il est fort probable que ce changement de géométrie déstabilise un motif important dans cette région de l'ARN. Quant aux G757 et C758, ils lient probablement un ou plusieurs ions magnésiums, car ils sont à proximité l'un de l'autre et l'activité peut être récupérée en présence de manganèse. Considérant que ces trois nucléotides sont localisés dans le site actif, il est fort probable qu'ils jouent un rôle important pour stabiliser la structure tertiaire ou qu'ils participent dans le mécanisme de clivage. Puisque la seule structure du site actif résolue (état inactif) (Flinders and Dieckmann 2004) à ce jour n'est pas affectée par la présence de magnésium, il semble peu pertinent de comparer la localisation et l'impact des ions magnésium avec cette structure.

Malgré toutes les études effectuées à ce jour, le rôle des ions divalents dans la réaction de clivage du ribozyme VS est mal compris, car il existe plusieurs explications possibles et il est difficile de les discriminer. De prime abord, il est évident que la présence des ions monovalents et divalents est critique pour le repliement des structures secondaire et tertiaire du VS. En effet, ces ions permettent de neutraliser les charges négatives qui se forment localement du à la présence des groupements phosphates. Le rôle des ions divalents



est pourtant plus complexe que cette simple explication (Sigel and Pyle 2007). Étant donné que plusieurs sites de liaison sont localisés proche du site actif et du site de clivage, il est fort probable que des ions divalents, tel que le magnésium, participent au mécanisme de clivage directement ou indirectement. Cette contribution pourrait se traduire par la présence de sites spécifiques où plusieurs charges négatives sont concentrées dans un espace restreint (ex. plusieurs groupements phosphate à proximité). La présence d'un ou plusieurs ions métalliques permettrait alors d'éviter le développement d'une charge négative trop importante dans ces sites et lors de la formation d'interactions tertiaires. D'autre part, ces ions magnésium pourraient aussi aider à stabiliser la charge négative qui se développe lors de la formation de l'intermédiaire dans la réaction de transestérification. La nécessité d'ions divalents pour la réaction peut également s'expliquer par la présence de pKas modifiés dans le site de clivage et dans le site actif. En effet, il a été démontré chez certaines protéines et chez certains ARNs que la présence d'ions métalliques peut modifier le pKa ou altérer la nucléophilicité de certains groupes (Revu dans (Sigel and Pyle 2007)). Le ribozyme VS pourrait être un autre exemple de ce type d'interactions électrostatiques. La situation étant complexe, la relation entre les ions métalliques et la fonction du ribozyme VS s'explique probablement par plusieurs des éléments mentionnés précédemment. Il reste donc beaucoup de travail à faire pour avoir une meilleure compréhension du rôle des ions métalliques dans le ribozyme VS et dans les ARNs en général.

## 1.4 Hypothèses et Objectifs

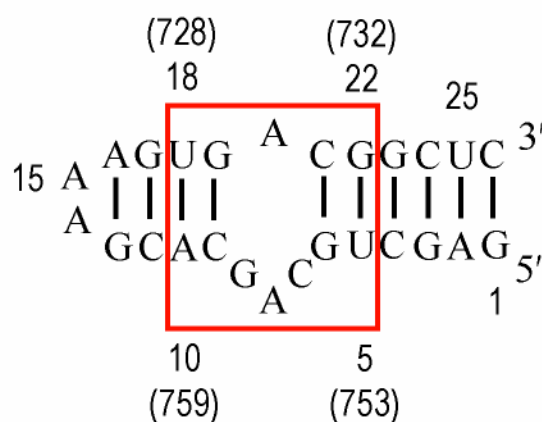
Bien que plusieurs laboratoires travaillent à augmenter les connaissances sur le ribozyme VS, le mécanisme de clivage et sa relation avec la structure sont encore mal compris. Le ribozyme VS est l'un des rares ribozymes pour lequel il n'existe aucune structure tridimensionnelle entière du ribozyme actif. Ceci s'explique par le fait que malgré 15 ans de recherches intensives, aucun groupe n'a réussi à le cristalliser et le ribozyme entier a une taille supérieure à ce qui est couramment étudié par RMN. Étant donné ces obstacles, il est nécessaire d'utiliser une approche alternative afin d'obtenir des informations structurales sur le ribozyme VS. Dans le cas des ARNs de grande taille, et du ribozyme VS, l'ARN est divisé en

domaines qui sont étudiés indépendamment les uns des autres. Cette approche modulaire a permis d'obtenir des structures pertinentes pour plusieurs ARNs, tels que le « Internal Ribosome Entry Site » (IRES) du VHC (Lukavsky, Kim et al. 2003), la tige-boucle I de l'ARNsn U2 (Sashital, Venditti et al. 2007) et le domaine 6 de l'intron du groupe II (Erat, Zerbe et al. 2007). Cette approche peut être très utile, mais elle est valide seulement si la structure du domaine isolé est représentative de la structure présente dans le contexte de l'ARN entier. Il est donc important de faire bien attention à ne pas obtenir des structures qui ne reflètent pas la réalité. Ainsi, il est essentiel de démontrer que la structure de la tige-boucle ou du domaine isolé en question n'est pas altérée en utilisant des études biochimiques.

À ce jour, plusieurs domaines du ribozyme VS ont été étudiés par cette approche, certains avec plus de succès que d'autres. Plusieurs structures de dérivés du substrat (tige-boucle I) (Michiels, Schouten et al. 2000; Flinders and Dieckmann 2001; Hoffmann, Mitchell et al. 2003) ont été déterminées par RMN pour obtenir des informations structurales sur le site de clivage. De plus, la tige-boucle V, qui interagit avec le substrat pour former une interaction tertiaire, a été étudiée en présence et en absence de magnésium afin de mieux caractériser la reconnaissance du substrat et la formation de l'interaction boucle-boucle (Campbell and Legault 2005; Campbell, Bouchard et al. 2006). Une structure a aussi été publiée pour le site actif (tige-boucle VI) (Flinders and Dieckmann 2004). Cette dernière représente un état inactif du site actif puisque les éléments structuraux présents ne correspondent pas aux données biochimiques et cinétiques. La question par rapport à la structure du site actif reste donc entière.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de clivage, ainsi que la relation entre la structure et la fonction dans l'ARN, nous avons décidé de revisiter la structure du site actif du ribozyme VS. Afin d'obtenir un site actif qui représente la structure exhibée dans le contexte du ribozyme entier, une nouvelle approche a été utilisée pour « designer » l'ARN étudié. Afin d'obtenir une structure représentative du site actif présent dans le ribozyme entier, nous avons créé un ARN de 26 nucléotides (figure 11) qui reproduit la structure secondaire formée dans le site actif du ribozyme VS (figure 2). Les nucléotides 5-11 et 18-22 dans l'ARN SLVI sont identiques à ceux retrouvés aux positions 753-759 et 728-732 du ribozyme VS de

*Neurospora* et forment le domaine de la boucle A730 (Encadré rouge, figure 11). Ce domaine comprend la boucle interne A730, ainsi que deux paires de base de chaque côté de cette boucle. Pour forcer cet ARN à former la structure voulue, des paires de bases ont été ajoutées de chaque côté de la boucle et un côté de l'ARN a été fermé par une boucle GAAA, qui est un motif stable bien connu. La séquence de l'ARN est présentée dans la figure 11.



**Figure 11 : Structures primaire et secondaire du fragment SLVI utilisé pour les études de RMN.** Les nucléotides encadrés en rouge indiquent les nucléotides qui sont présents dans le domaine de la boucle A730 du ribozyme VS.

L'objectif principal de la recherche présentée dans ce mémoire est de mieux comprendre les éléments impliqués dans le mécanisme de clivage du ribozyme VS de *Neurospora*. Afin d'atteindre cet objectif, une structure à haute résolution d'un fragment contenant le domaine de la boucle A730 (figure 11) sera déterminée par RMN. La structure obtenue sera ensuite comparée aux données biochimiques existantes pour vérifier si la structure moyenne est significative. Suite à l'obtention de cette structure, nous tenterons de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse stipulant que l'adénine A756, qui est présente dans le site actif, joue un rôle important dans le clivage du lien phosphodiester en agissant comme acide ou base dans un mécanisme de catalyse par acide/base générale. La RMN du carbone-13 sera utilisée pour vérifier si cette adénine possède un pKa modifié, lui permettant d'agir comme acide ou base général dans le mécanisme réactionnel.

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire nous aidera à acquérir une meilleure compréhension des éléments structuraux responsables de la catalyse enzymatique

et du rôle des ions métalliques chez le ribozyme VS de *Neurospora*. Finalement, cette recherche contribuera à augmenter nos connaissances fondamentales sur la relation entre la structure et la fonction chez le ribozyme VS et les ARNs en général.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### 2.1 Synthèse de l'ARN

#### 2.1.1 Préparation des échantillons d'ARN

Des échantillons non-marqués, marqués en  $^{15}\text{N}$ , ainsi que marqués en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  de l'ARN SLVI ont été synthétisés *in vitro* à l'aide de la polymérase à ARN du bactériophage T7 (Milligan, Groebe et al. 1987). La matrice d'ADN utilisée pour la transcription est double brins et les deux derniers nucléotides en 5' du brin codant contiennent une modification chimique C2'-methoxy (Integrated DNA Technology) (Milligan, Groebe et al. 1987; Kao, Zheng et al. 1999). L'ARN SLVI a été purifié par électrophorèse sur gels dénaturants (PAGE) 20% d'acrylamide et déphosphorylé en 5' par la phosphatase alcaline de veau (Roche Diagnostics) tel qu'indiqué par le fabricant. Il a ensuite été purifié par chromatographie sur résine échangeuse d'anion DEAE-Sephacel (Amersham Biosciences) et les fractions contenant l'ARN pur ont été concentrées par ultracentrifugation dans le tampon suivant : 10 mM Sodium Cacodylate (pH 6.5), 50 mM KCl, 0.05 mM  $\text{NaN}_3$  dans 90% $\text{H}_2\text{O}$ /10% $\text{D}_2\text{O}$  à l'aide de Centricon-3 (Millipore, MA). Les échantillons ont été chauffés 2 minutes à 95 °C, puis refroidis dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes pour favoriser la conformation « hairpin ». Le tampon a ensuite été échangé par des lavages consécutifs dans des Centricon-3 pour les études de RMN [10 mM Sodium Cacodylate (pH 6,5), 50 mM KCl, 0.05mM  $\text{NaN}_3$  et 5 mM  $\text{MgCl}_2$  99.995% (Sigma-Aldrich, MO) dans 90% $\text{H}_2\text{O}$ /10% $\text{D}_2\text{O}$ ]. Les échantillons utilisés pour les études structurales contiennent entre 0.4 et 1.5 mM d'ARN SLVI. Les échantillons dans 100%  $\text{D}_2\text{O}$  ont été obtenus par une série de lyophilisation et resuspension de l'ARN dans du  $\text{D}_2\text{O}$  99.996% (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., MA).

#### 2.1.2 Gels natifs

Afin de vérifier la conformation de l'ARN SLVI, des échantillons contenant de 2 à 10  $\mu\text{g}$  d'ARN ont été mis sur des gels d'acrylamide 7.5% (acrylamide : bis (37.5:1)) non dénaturants. Le tampon pour la migration (TB) contenait 50 mM de tris borate à pH 8.0 et 5

mM d'acétate de magnésium. Les gels ont été pré-migrés pendant 30 minutes à 200 V. Les échantillons ont ensuite été mis sur le gel et ils ont migrés pendant 2h à 250 V à 4°C. Les gels ont été colorés par la suite avec du « Stains All » (Sigma-Aldrich).

## 2.2 Études de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

### 2.2.1 Spectroscopie RMN

Toutes les données RMN ont été acquises soit sur un INOVA 500 MHz, un INOVA 600 MHz ou un INOVA 800 MHz de Varian NMR, Inc. Les spectromètres utilisés pour acquérir les données étaient équipés, soit avec une sonde  $^1\text{H}$  à triple résonances (sonde standard ou cryogénique) ou avec une sonde  $^1\text{H} \{^{15}\text{N}-^{31}\text{P}\}$  à détection indirecte. Les données ont été transformées avec l'ensemble de programmes NMRPipe/NMRDraw (Delaglio, Grzesiek et al. 1995) et visualisées avec NMRView (Johnson and Blevins 1994). Tous les protons échangeables, ainsi que leurs azotes associés ont été attribués à 15 °C dans 90% $\text{H}_2\text{O}$ /10% $\text{D}_2\text{O}$  à l'aide des expériences suivantes : 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC optimisés pour les protons iminos et aminos (Kay, Keifer et al. 1992),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY (Piotto, Saudek et al. 1992; Grzesiek and Bax 1993) avec un temps de mixage de 160 ms, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY (Mueller, Legault et al. 1995), 2D H(NCCC)H (Simorre, Zimmermann et al. 1995) pour les uraciles et les cytosines, 2D H(NC)-TOCSY-(C)H (Simorre, Zimmermann et al. 1996) pour les guanosines et 2D (H)N(C)-TOCSY-(C)H (Simorre, Zimmermann et al. 1996) pour les adénines. Un 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC optimisé pour les transferts via  $J=7.0$  Hz (Legault 1995) et un 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC  $J=21$  Hz (Legault 1995) ont été acquis dans le  $\text{D}_2\text{O}$  à 25°C pour attribuer les N1 des uridines et les N3 des pyrimidines, ainsi que les azotes N7 et N9 des purines. L'attribution des protons non-échangeables, ainsi que leurs carbones associés a été obtenue dans le  $\text{D}_2\text{O}$  à 25 °C à l'aide de 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  MQ-(HC)N(C)H (Skleňár, Dieckmann et al. 1998), 3D CT-HCCH-COSY (Pardi and Nikonowicz 1992), 3D HCCH-TOCSY (Pardi and Nikonowicz 1992) et de 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY (Ikura, Kay et al. 1990) avec des temps de mixage de 80, 160 et 200 ms. Les déplacements chimiques des  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$

ont été calibrés à 25°C par rapport à un échantillon externe d'acide 2,2-diméthyl-2-silapentane-5-sulfonique référencé à 0.0 ppm.

### 2.2.2 Contraintes structurales

Les paires de bases formées dans la tige-boucle ont été établies à l'aide d'un spectre HNN-COSY (Dingley and Grzesiek 1998) à 15°C. Les contraintes de distances dérivées de NOEs entre les protons échangeables ont été extraites à partir des spectres suivants dans 90% $\text{H}_2\text{O}$ /10% $\text{D}_2\text{O}$  : un  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY (mix = 160 ms), deux 3D NOESY optimisés pour les protons aminos (mix = 80 et 160 ms) et deux 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY (mix = 80 and 160 ms). Ces contraintes NOEs ont été séparées en 3 groupes : forts (1.8-3.3 Å), moyens (1.8-5.0 Å) et faibles (1.8-7.0 Å) en fonction de l'intensité des signaux dans les spectres. Les contraintes NOEs pour les protons non-échangeables ont été extraites à partir de spectres 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY avec des temps de mixage de 80 ms et 160 ms. Ces contraintes NOEs ont été séparées en 4 groupes : forts (1.8-3.3 Å), moyens (1.8-4.2 Å), faibles (1.8-5.5 Å) et très faibles (1.8-7.0 Å) en fonction de l'intensité des signaux dans les spectres. Les angles dièdres ( $\delta$ ) des riboses ont été obtenus suite à l'analyse des spectres DQF-COSY (Rance, Sorensen et al. 1983) et HCCH E.COSY (Schwalbe, Marino et al. 1994). La conformation de tous les riboses a été fixée en C3'-endo ( $\delta = 86 \pm 10^\circ$ ) sauf pour les résidus C7, A8 et A11. La conformation de ces résidus n'a pas été restreinte puisque leur valeur de  $^3J_{\text{H1}'\text{-H2'}}$  correspond à une valeur moyenne entre la conformation C3'-endo et C2'-endo. Les angles dièdres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$  ont été restreints pour la plupart des résidus en fonction d'une étude comparative des NOEs (Wijmenga, Mooren et al. 1993).

### 2.2.3 Calculs des structures

Les structures ont été calculées à l'aide du programme X-PLOR-NIH version 2.0.6 (Brünger 1992) tel que décrit précédemment (Campbell and Legault 2005). À partir d'un ensemble de 50 structures contenant des angles de torsion aléatoires, nous avons trouvé 33 structures qui satisfont les contraintes expérimentales (aucune violation des NOEs  $> 0.1$  Å, aucune violation des angles de  $> 5^\circ$ ) Les 20 structures de plus basse énergie ont été

analysées et utilisées pour calculer une structure moyenne qui a été minimisée par rapport à toutes les contraintes expérimentales. Les structures ont été visualisées et analysées avec PyMol (DeLano Scientific).

## 2.3 Études des pKas

### 2.3.1 Études de pH

Toutes les valeurs de pH ont été mesurées dans le D<sub>2</sub>O avec une électrode en verre (Radiometer America Inc., OH) qui a été placée directement dans l'échantillon de RMN. Le pH a été ajusté avec du 0.1 M DCl ou du 0.1 M NaOD. Les échantillons ont été titrés à partir du pH 6.2 jusqu'à 5.4 par intervalle de 0.4 unité. Le pH a ensuite été rétabli à 6.6 et titré jusqu'à 8.2 par intervalle de 0.4 unité. Les valeurs de pH rapportées correspondent à la valeur moyenne du pH mesuré avant et après les expériences de RMN. Pour chaque point sur la courbe de pH, des spectres 1D <sup>1</sup>H et 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC ont été acquis à 25 °C.

### 2.3.2 Détermination du pKa des adénines

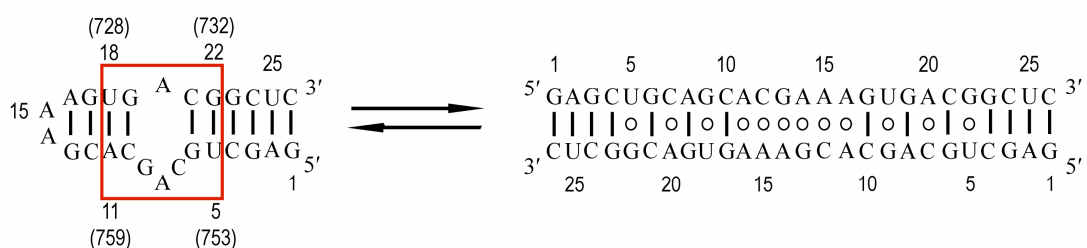
Le pKa de toutes les adénines présentes dans le fragment SLVI a été déterminé à partir du déplacement chimique du carbone-13 des C2 des adénines en utilisant l'équation de Henderson-Hasselbalch. L'équation, dans le cas d'une seule protonation, est décrite par la formule suivante :  $\text{pH} = \log \left( \frac{\Delta T - \Delta}{\Delta} \right) + \text{pKa}$ , où  $\Delta T$  représente le changement total du déplacement chimique du C2 entre les états non-protonés et protonés à un pH précis. Dans cette équation,  $\Delta$  représente la variation observée pour le déplacement chimique du C2 à un pH donné. La protonation complète des résidus A8 (A756) et A20 (A730) n'a pas pu être observée dans l'écart de pH étudié (pH 4.7 – 8.2). La valeur de  $\Delta$  a donc été estimée entre 6 et 8 ppm, où 8 ppm est la valeur du nucléotide monophosphate libre (Legault and Pardi 1994) et 6 ppm correspond à la valeur minimale citée dans la littérature pour une adénine dans un ARN replié (Smith and Nikonowicz 1998).



## Chapitre 3 : Résultats

### 3.1 Conformation de l'ARN SLVI

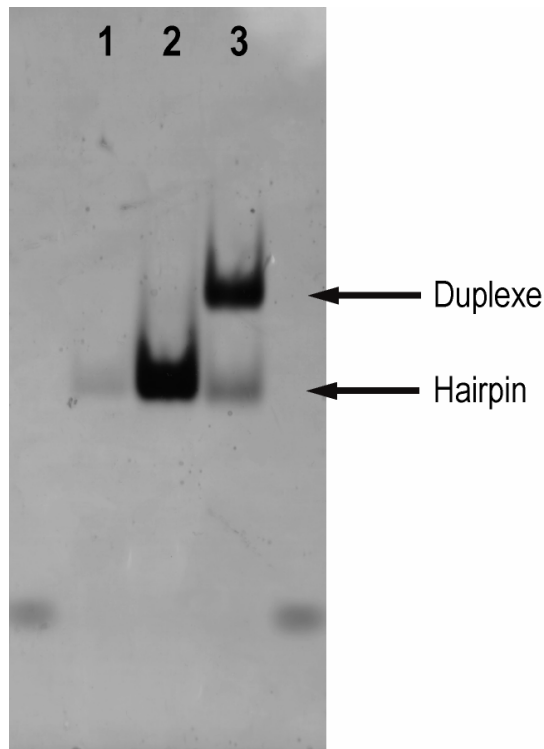
Dans le but d'étudier plus en détail le site actif du ribozyme VS, nous avons synthétisé un fragment d'ARN de la tige-boucle VI qui contient la boucle A730. Afin d'obtenir une structure représentative du site actif présent dans le ribozyme entier, nous avons créé un ARN de 26 nucléotides (figure 12, gauche) qui reproduit la structure secondaire formée dans le site actif du ribozyme VS (figure 2). Les nucléotides 5-11 et 18-22 dans l'ARN SLVI sont identiques à ceux retrouvés aux positions 753-759 et 728-732 du ribozyme VS de *Neurospora* et forment le domaine de la boucle A730. Ce domaine comprend la boucle interne A730, ainsi que deux paires de base de chaque côté de cette boucle. Afin d'obtenir une tige-boucle qui conserve la structure voulue, des paires de bases ont été ajoutées à chaque extrémité de la boucle et un côté de l'ARN a été fermé par une boucle GAAA (famille des GNRA), qui est un motif stable bien connu. L'identité des paires de bases ajoutées n'est pas importante du moment qu'elles favorisent la formation de la conformation « hairpin ». Les 3 premiers nucléotides de la séquence ont été choisis de façon à optimiser la synthèse enzymatique du fragment SLVI par la polymérase à ARN du phage T7 (Milligan, Groebe et al. 1987).



**Figure 12 : Représentation de l'équilibre entre les conformations « hairpin » et duplexe de l'ARN SLVI.** Les nucléotides qui sont présents dans la boucle interne du site actif du ribozyme VS sont encadrés en rouge et leur numérotation est indiquée entre parenthèses. Les traits noirs indiquent les pb Watson-Crick alors que les cercles vides indiquent la formation de pb non canoniques.

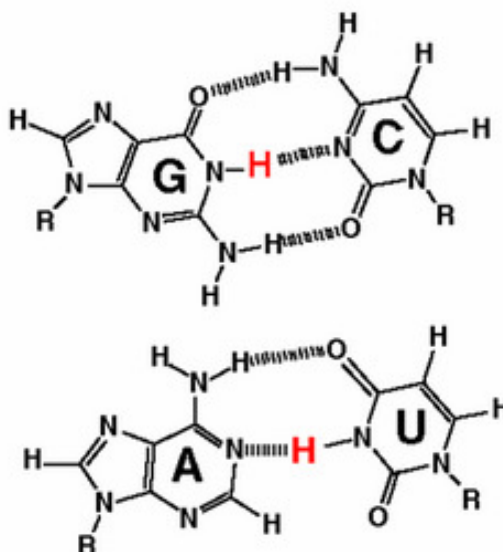
Avant de déterminer la structure du fragment SLVI, il est important de vérifier qu'il adopte la conformation attendue. Dans le contexte du ribozyme entier, le site actif adopte un

repliement précis. Cette structure unique et spécifique est le résultat d'interactions secondaire et tertiaires entre les différentes parties du ribozyme. Lorsqu'on isole un fragment, il est possible que la conformation soit différente puisque ces interactions sont absentes et ne peuvent pas diriger le repliement de l'ARN. De plus, lors des études RMN, le fragment est présent à haute concentration et il est fréquent que deux molécules interagissent ensemble pour former un duplexe. Il faut donc tenir compte de l'équilibre conformationnel « hairpin » - duplexe (figure 12). À cause de ces phénomènes, il est essentiel de déterminer si le fragment SLVI forme la tige-boucle attendue dans les conditions de RMN. Ainsi, des études de gels natifs ont été effectuées pour déterminer la conformation de l'ARN SLVI dans des conditions identiques à celles utilisées pour les études structurales (figure 13). Un échantillon de RMN a été préparé tel que décrit dans la section 2.1.1 et une petite quantité de l'ARN SLVI a été mise sur gel non-dénaturant pour vérifier sa conformation. Tel que démontré sur le gel, l'ARN SLVI est présent sous une seule conformation (une bande visible) à basse et à haute concentration (puits 1 et 2). La bande de l'ARN SLVI migre au même endroit que la bande la plus basse de l'ARN contrôle SL1T. Étant donné que ces deux ARNs ont une taille similaire, cela indique que l'ARN SLVI est présent uniquement sous la conformation « hairpin ».



**Figure 13 : Évaluation de la conformation du fragment SLVI par gel natif.** Les puits 1 et 2 contiennent respectivement 1 et 10 µg de l'ARN SLVI (26-MER). Le puit 3 contient 10 µg de l'ARN SL1T (28-mer) (5'-GAGCGAAGGGCAUCGUCGGCCCGAGCUC-3') qui est principalement dans la conformation duplexe (90% duplexe :10% hairpin) (résultats non publiés).

Une autre excellente façon de confirmer la structure secondaire de l'ARN SLVI est d'observer les protons iminos par RMN. Ceux-ci sont liés au N1 des guanines et au N3 des uridines (figure 14). Lorsque le nucléotide est en solution, ce proton est en échange rapide avec le solvant, et donc invisible par RMN. Cependant, dans les ARNs repliés, ces protons sont souvent stabilisés. Par exemple, la formation d'une paire de bases Watson-Crick G-C entraîne la formation d'un pont hydrogène entre le proton imino de la guanine et l'azote de la cytosine, ce qui permet de le stabiliser. Lorsque les protons iminos sont ainsi stabilisés, ils apparaissent entre 10 et 15 ppm dans le spectre du proton.



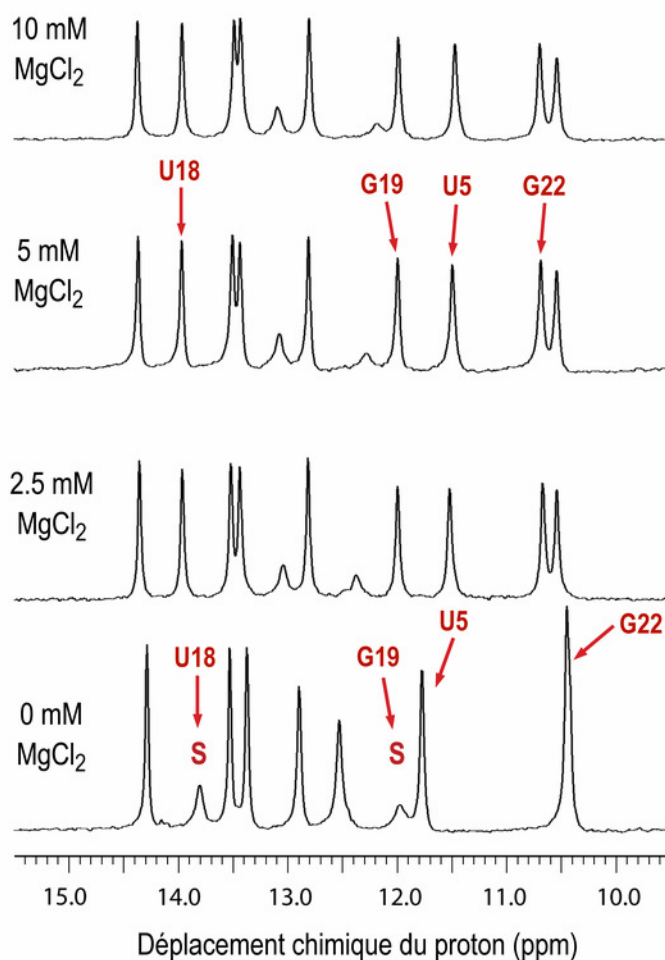
**Figure 14 : Représentation schématique de paires de bases Watson-Crick.** Les ponts hydrogène sont indiqués par les lignes pointillées et les **H** représentent les protons iminos.

La conformation de l'ARN SLVI a donc été vérifiée à l'aide de spectres  $^1\text{H}$  1D. Le nombre de protons iminos visibles (11 signaux), ainsi que leur répartition en G et en U (figure 15, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) supportent la présence de la conformation « hairpin ». De plus, nous pouvons écarter la formation d'un duplexe, car cela aurait entraîné la formation de plusieurs paires de bases non- canoniques (G-A, A-A et C-A) qui ne sont pas observées (figure 12). La dimérisation de l'ARN SLVI aurait aussi engendré la formation de deux paires de bases G-U distinctes, alors qu'une seule est présente. Le spectre du proton de l'ARN SLVI correspond donc à ce qui est attendu pour la conformation « hairpin ».

### 3.2 Effets du Magnésium et du pH

Étant donné que le ribozyme VS est actif en présence d'ions divalents (Saville and Collins 1991; Collins and Olive 1993) et que le site actif possède un ou plusieurs sites de liaison spécifiques au magnésium (Sood, Beattie et al. 1998), nous avons poursuivi nos études de l'ARN SLVI par un titrage avec diverses concentrations de magnésium afin d'évaluer si la

présence d'ions divalents affecte la conformation de l'ARN. Le titrage est présenté à la figure 15.



**Figure 15 : Région des protons iminos dans le spectre  $^1\text{H}$  1D du fragment SLVI en présence de diverses concentrations de  $\text{MgCl}_2$ .** Les spectres ont été acquis à 15 °C et les signaux appartenant aux nucléotides qui sont présents dans le domaine de la boucle A730 du ribozyme natif sont identifiés en rouge. Les signaux identifiés par un **S** sont stabilisés en présence de magnésium.

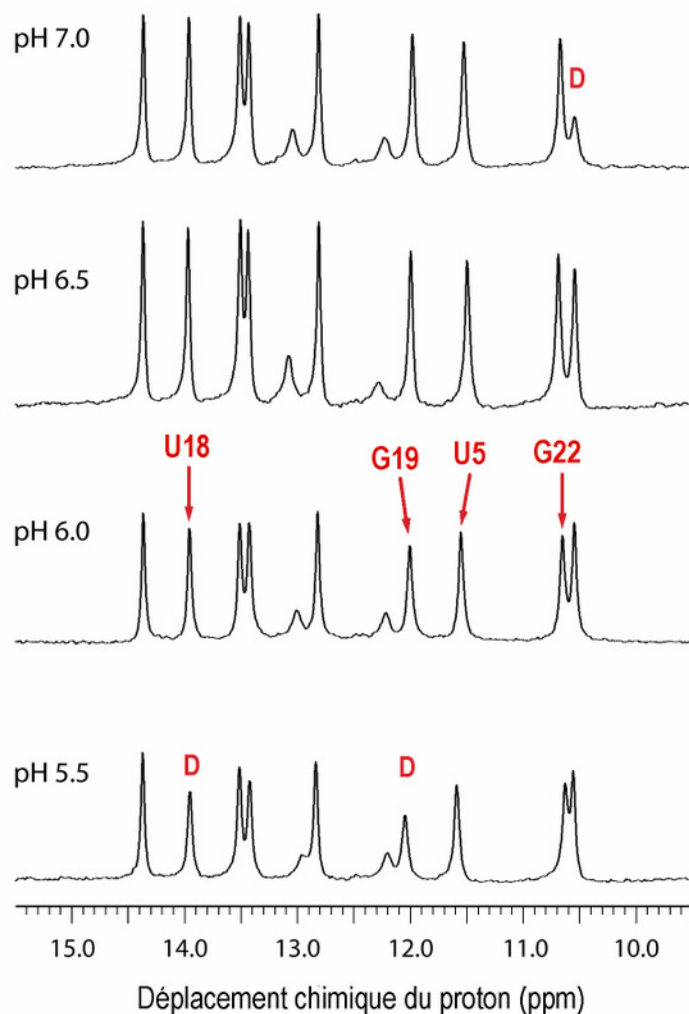
Tel que montré à la figure 15, les spectres des protons iminos en absence et en présence de magnésium sont relativement différents. En effet, les signaux sont mieux dispersés en présence de magnésium, ce qui indique un changement dans la structure. Il y a aussi deux signaux qui sont stabilisés en présence d'ions magnésium, soit les protons iminos de U18 (U728) et G19 (G729). Ces deux signaux correspondent aux protons iminos des deux

paires de bases qui ferment une extrémité de la boucle interne (pour attribution voir figure 17). Ces résultats indiquent que cette boucle est stabilisée en présence d'ions magnésium.

Par ailleurs, le spectre du proton contient 11 signaux iminos, dont deux qui sont très faibles et larges. Ils appartiennent au proton imino du G6 (13.08 ppm), qui ferme l'autre extrémité de la boucle interne et au proton imino du G1 (12.19 ppm), soit la première paire de bases dans la tige. Ces signaux sont larges et peu intenses, car leur proton imino est en échange rapide avec le solvant. Les paires de bases G1-C26 et G6-C21 (G754-C731) sont donc présentes dans la structure secondaire du fragment SLVI, mais moins stables.

Étant donné que l'activité du ribozyme VS varie également en fonction du pH, nous avons poursuivi nos études en vérifiant son effet sur la structure du fragment SLVI. Des spectres  $^1\text{H}$  1D de l'ARN SLVI ont donc été acquis à différents pH afin d'investiguer cet aspect. Tel que démontré à la figure 16, les signaux des protons iminos qui sont à proximité de la boucle interne sont moins intenses à bas pH. Cette diminution sélective de l'intensité des signaux indique que les paires de bases qui sont à une extrémité de la boucle interne A11-U18 et G19-C10 (U728-A759 et G729-C758) deviennent instables dans ces conditions. Ce phénomène est probablement dû à l'ionisation de certains résidus dans la boucle interne (voir section 3.5 et chapitre 4).

Les études préliminaires présentées dans cette section nous ont permis de déterminer les conditions optimales pour obtenir une structure stable et unique de l'ARN SLVI. Les études de RMN pour déterminer la structure détaillée du fragment SLVI ont ainsi été effectuées dans le tampon suivant : 10 mM Sodium Cacodylate (pH 6.5), 50 mM KCl, 0.05 mM  $\text{NaN}_3$  et 5 mM  $\text{MgCl}_2$  99.995%.



**Figure 16 : Région des protons iminos dans le spectre  $^1\text{H}$  1D du fragment SLVI à différents pH en présence de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ .** Le pH est indiqué à gauche et les signaux identifiés d'un **D** sont déstabilisés au pH indiqué. Les spectres ont été acquis à 15 °C et les signaux appartenant aux nucléotides des paires de bases qui ferment la boucle A730 dans le site actif du ribozyme natif sont identifiés en rouge.

### 3.3 Attribution des Signaux de l'ARN SLVI

La structure du fragment SLVI a été obtenue à l'aide d'expériences de RMN homonucléaires et hétéronucléaires en utilisant des échantillons non-marqués, marqué en  $^{15}\text{N}$  et marqués en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (Roberts 1993). L'attribution des résonances  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  est résumée dans l'annexe 1.

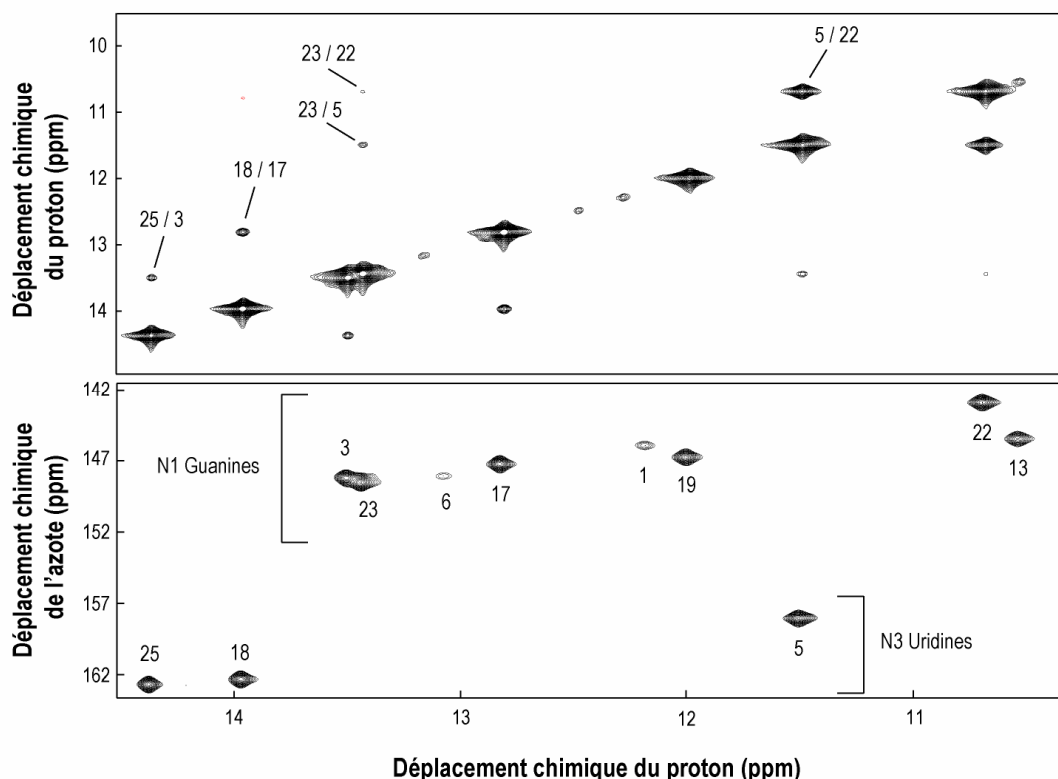
### 3.3.1 Protons échangeables

Les protons échangeables regroupent deux types de protons, soit les protons iminos et les protons aminos. Les protons iminos sont liés au N1 des guanines et au N3 des uridines (figure 14). Quant aux protons aminos, ils sont liés au N6 des adénines, au N4 des cytosines et au N2 des guanines. La méthode pour attribuer les protons iminos sera discutée en premier et celle pour attribuer les protons aminos sera abordée subséquemment.

Les protons iminos ont été attribués à l'aide des spectres  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY, 2D HNN-COSY et 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Dans le spectre 2D NOESY (figure 17), un signal hors-diagonale (« crosspeak ») est présent entre deux signaux iminos si ces protons sont à proximité dans l'espace (moins de 5 Å), tels que ceux de deux paires de bases adjacentes. La présence de ces signaux permet d'attribuer et d'identifier les protons iminos qui sont impliqués dans la formation de paires de bases. L'attribution des signaux a débuté avec l'identification du signal caractéristique de la paire de base G-U (figure 17). En effet, deux protons iminos sont à proximité dans cette paire de bases et ils émettent un signal hors de la diagonale qui est très intense. L'attribution des autres signaux a été obtenue en corrélant les signaux iminos qui vont d'une paire de bases à l'autre à partir de ce point de départ. La plupart des signaux hors de la diagonal attendus sont présents et identifiés à la figure 17. Il manque cependant un signal hors de la diagonale entre le G22 et le G6, entre le U5 et le G6, ainsi qu'un autre entre le U25 et le G1. Étant donné que les signaux iminos des paires de bases G6-C21(G754-C731) et G1-C26 sont en échange rapide avec le solvant, ces signaux hors de la diagonale sont absents dans ce type de spectre. Ceci n'implique en aucun cas que ces paires de bases sont absentes; seulement qu'elles sont instables et invisibles dans ce type de spectre. L'existence de ces paires de bases a été confirmée à l'aide d'autres spectres comme le 2D HNN-COSY. Malgré le fait qu'aucun signal hors de la diagonale ne soit visible entre le U18 et le G19 dans le spectre montré à la figure 17, celui-ci est présent. Ce signal est cependant de très faible intensité et invisible au niveau du spectre présenté. L'existence de toutes les paires de bases présentes à la figure 11 a ensuite été confirmée à l'aide de NOEs inter-résiduels, ainsi qu'avec le spectre 2D HNN-COSY (résultats non montrés). La présence des signaux iminos reliant les différents résidus dans le spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY (figure 17)



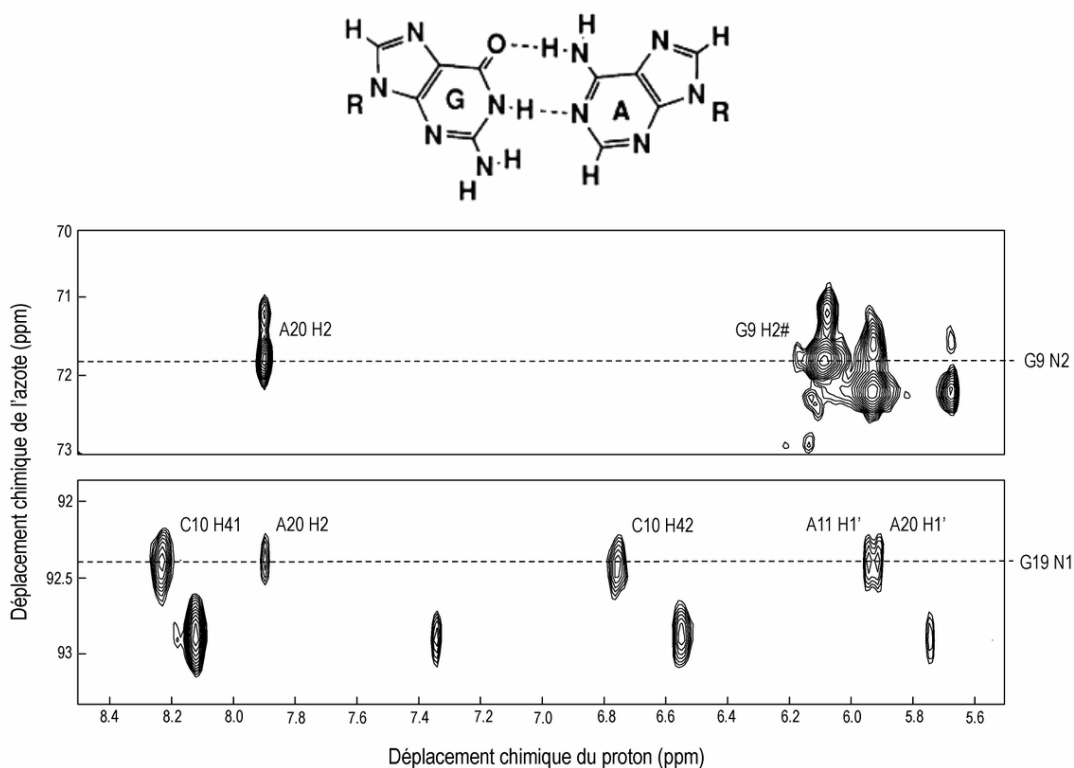
amène une preuve supplémentaire de la formation d'une structure secondaire similaire à celle retrouvée dans la tige VI de la structure secondaire du ribozyme VS (Rastogi, Beattie et al. 1996).



**Figure 17 : Région des protons iminos confirmant la structure secondaire de l'ARN SLVI. (Panneau du haut)** Région des protons iminos du spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY. Le spectre a été acquis à partir d'un échantillon non-marqué dans 90%  $\text{D}_2\text{O}$ /10%  $\text{H}_2\text{O}$  à 15°C avec un temps de mixage de 160 ms. **(Panneau du bas)** Spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC optimisé pour les protons iminos. Le spectre a été acquis à partir d'un échantillon marqué en  $^{15}\text{N}$  dans 90%  $\text{D}_2\text{O}$ /10%  $\text{H}_2\text{O}$  à 15°C. Ce spectre permet d'identifier et de différencier la fréquence des signaux iminos appartenant à des guanines ou des uridines en fonction de leur déplacement chimique dans l'azote.

Par la suite, la présence de certains NOEs dans le 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY et dans le 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY a démontré l'existence d'une paire de bases G-A symétrique (type VIII, (Saenger 1984)) entre le G9 et le A20 (G757-A730). Entre autres, il y a un NOE de forte intensité qui est présent entre le H2 de A20 et le  $\text{NH}_2$  de G9 (figure 18 - panneau du haut), ainsi qu'un NOE d'intensité moyenne entre le H2 de A20 et le NH de G19 de la paire de bases adjacentes (figure 18 - panneau du bas). Les NOEs identifiés dans le panneau du bas,

ainsi que d'autres NOEs provenant du 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY indiquent que la pb G9-A20 (G757-A730) est bien empilée sous la pb C10-G19 (C758-G729). Cette paire de bases G-A n'a jamais été identifiée par le passé, que ce soit par des études biochimiques ou structurales. Tel que discuté plus loin, cette pb joue un rôle primordial dans la formation et la stabilisation de la boucle interne.



**Figure 18 : Régions du spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY démontrant la présence d'une paire de bases G-A symétrique dans la boucle interne.** Le spectre présenté a été acquis sur l'ARN SLVI marqué en  $^{15}\text{N}$  dans 90%  $\text{D}_2\text{O}$ /10%  $\text{H}_2\text{O}$  à  $15^\circ\text{C}$  avec un temps de mixage de 160 ms. Tous les signaux pertinents à la formation ou l'empilement de la paire de bases G-A symétrique sont identifiés. **(Panneau du haut)** Région du spectre à la fréquence  $^{15}\text{N}$  du  $\text{NH}_2$  de G9. **(Panneau du bas)** Région du spectre à la fréquence  $^{15}\text{N}$  du  $\text{NH}$  de G19.

Ainsi, la plupart des protons iminos ont été attribués grâce aux spectres  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY, 2D HNN-COSY et 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY. Les cas plus ambigus ont été attribués à l'aide d'expériences complémentaires (2D  $\text{H}(\text{NCCC})\text{H}$ , 2D  $\text{H}(\text{NC})\text{-TOCSY-(C)H}$  et 2D  $(\text{H})\text{N(C)-TOCSY-(C)H}$ ). Quant aux protons aminos, ils ont été attribués à partir des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D NOESY, 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CPMG-NOESY et 3D  $^{15}\text{N}$ -edited

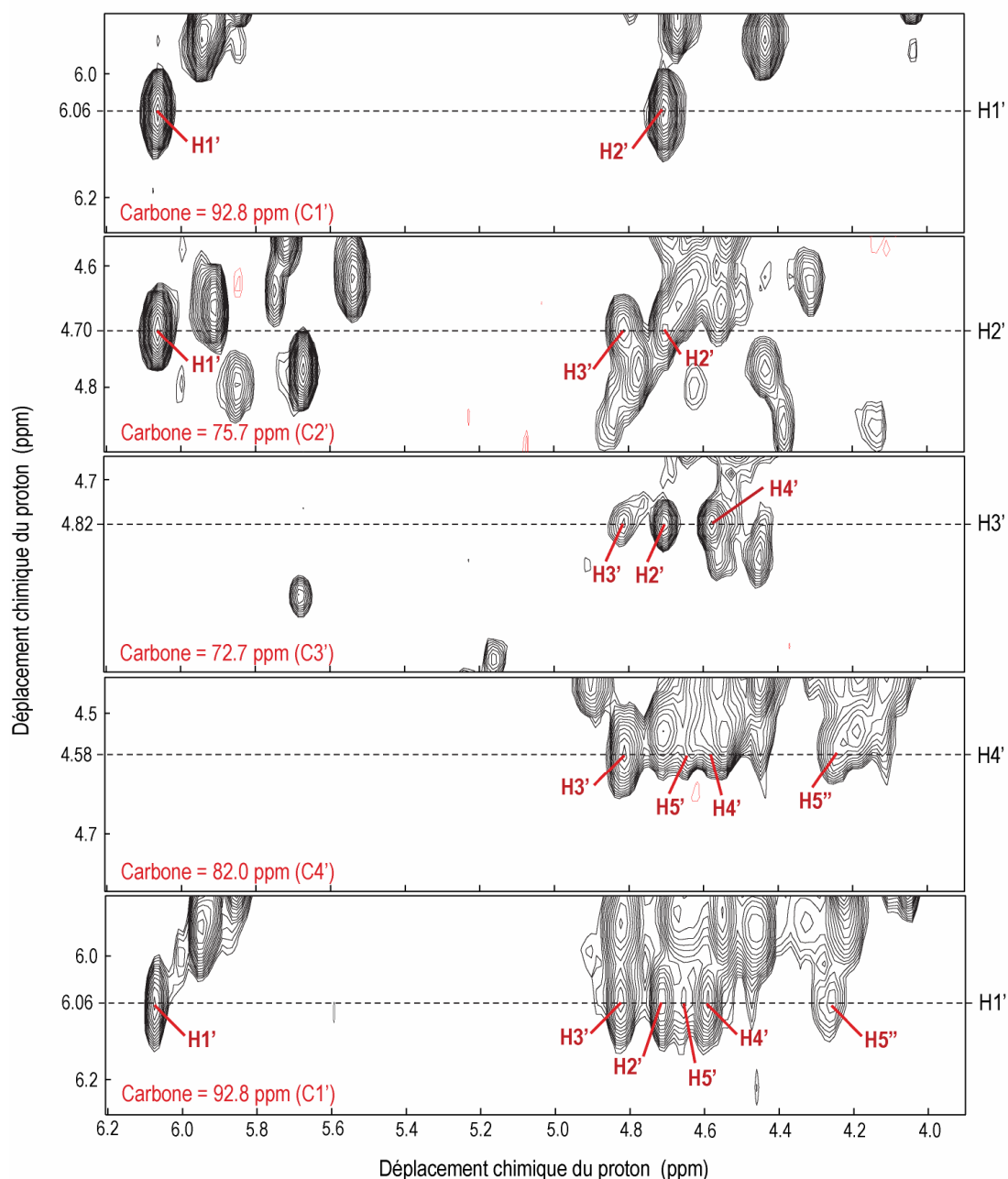
NOESY-HMQC optimisé pour les protons aminos afin d'obtenir des contraintes de distances supplémentaires entre les protons échangeables de la structure.

La détermination de la structure secondaire de l'ARN nous a donc permis de vérifier la conformation de l'ARN (section 3.1), mais aussi d'obtenir des contraintes pour le calcul de la structure. En effet, pour chaque paire de bases qui est formée, des contraintes de distance et de planarité ont ajoutées au calcul structural afin de tenir compte de la structure secondaire et d'améliorer la géométrie de l'hélice.

### 3.3.2 Protons non-échangeables des riboses

Chaque ribose contient six protons non-échangeables (H1', H2', H3', H4', H5' et H5'') qui forment plusieurs NOEs avec les nt attenants. Afin d'identifier ces NOEs qui sont importants pour la structure, il est nécessaire d'attribuer la fréquence de chaque proton dans les riboses. Ces résonances sont généralement retrouvées entre 3.5 et 6.5 ppm dans le spectre du proton. Le déplacement chimique de chaque proton dans les riboses a donc été attribué à l'aide de spectres 3D CT-HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY et 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC. Le 3D CT-HCCH-COSY permet de voir la corrélation entre deux protons qui sont reliés à deux carbones séparés par un lien chimique. Quand au 3D HCCH-TOCSY, il permet de voir une corrélation entre tous les protons qui appartiennent au même ribose. Le 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC est ensuite utilisé pour marquer avec une plus grande précision le déplacement chimique dans les dimensions du proton et du carbone de chaque résonance. Utilisées ensemble, ces expériences permettent d'identifier le déplacement chimique de tous les protons et carbones qui appartiennent à un ribose donné. L'exemple présenté à la figure 19 montre comment les protons appartenant au ribose du résidu A2 ont été attribués. Il s'agit de positionner le spectre aux fréquences du H1' dans le proton (6.06 ppm) et du C1' dans le carbone (92.8 ppm) du 3D CT-HCCH-COSY, puis d'observer à quelle fréquence un signal hors de la diagonale (« crosspeak ») est visible. Ceci permet d'identifier le déplacement chimique dans le proton du H2', soit 4.70 ppm. Il faut ensuite trouver la fréquence du C2' dans la dimension du carbone. On recherchera donc un signal à 4.70 ppm qui donne une corrélation au H1' à 6.06 ppm dans la région qui contient les C2'. Lorsqu'il sera identifié (75.7 ppm) (figure 19, 2<sup>e</sup> panneau), une

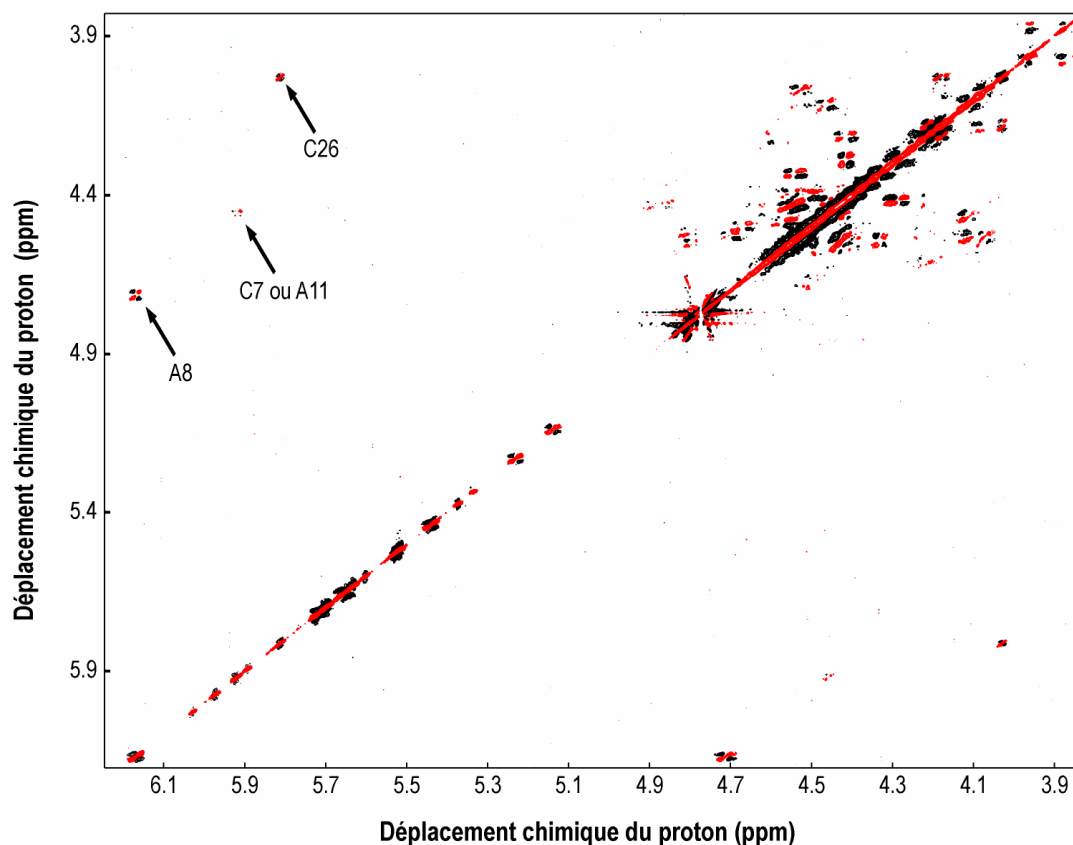
autre corrélation sera visible : elle appartient au H3' (4.82 ppm). Pour obtenir la fréquence du C3', on recherchera un signal à 4.82 ppm qui donne une corrélation au H2' dans la région qui contient les carbones C3'. Après avoir identifié la fréquence du C3' (72.7 ppm) (figure 19, 3<sup>e</sup> panneau), une corrélation pour le H2' qui est connu, ainsi qu'une nouvelle corrélation appartenant à la fréquence du H4' (4.58 ppm) seront visibles. À la fréquence du carbone C4' (82.0 ppm) (figure 19, 4<sup>e</sup> panneau), deux signaux supplémentaires sont engendrés par les protons H5' et H5'' (respectivement 4.63 et 4.25 ppm), en plus de la corrélation au H3'. Le panneau du bas (3D CT-HCCH-TOCSY à la fréquence du H1') contient toutes les résonances des protons appartenant au ribose du A2. Ceci permet donc de vérifier l'attribution faite avec le 3D HCCH-COSY. Le processus décrit dans cette figure est alors répété pour chaque résidu afin d'identifier la fréquence de tous les protons et carbones de chaque ribose.



**Figure 19 : Identification de la fréquence et attribution des protons du ribose appartenant au résidu A2.** Les protons du ribose sont identifiés en rouge sur chaque panneau et le plan du carbone est identifié en rouge également dans le coin en bas à gauche. La ligne en pointillée identifie la fréquence dans le proton qui est observée. Les quatre premiers panneaux sont extraits du 3D CT-HCCH-COSY. Le premier panneau montre la corrélation entre le H1' et le H2' à la fréquence du H1'. Le deuxième, la corrélation entre le H2' et le H1', ainsi que celle entre le H2' et le H3'. Le troisième panneau montre la corrélation entre le H3' et le H2', ainsi que celle entre le H3' et le H4' à partir de la fréquence du H3'. Le

quatrième panneau démontre la corrélation entre le H4' et le H3', ainsi que deux corrélations aux H5' et H5". Le dernier panneau provient du 3D HCCH-TOCSY, où toutes les corrélations à l'intérieur d'un ribose sont visibles.

Subséquentement, des contraintes de distance ont été obtenues pour les riboses à partir de l'intensité des signaux dans le spectre 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY. Des contraintes d'angles de torsion ont été obtenues à l'aide des spectres 3D HCCH E.COSY et 2D DQF-COSY, de même que par l'analyse semi-quantitative des NOEs. L'ensemble des contraintes obtenues à partir de ces expériences a été utilisé pour restreindre la conformation des riboses et ainsi améliorer la géométrie de l'hélice lors du calcul structural. En comparant l'information obtenue par ces différentes méthodes, nous avons déterminé que tous les riboses présents dans le fragment SLVI étaient dans la conformation C3'-endo à l'exception des résidus C7 (C755), A8 (A756), A11 (A759) et C26. En effet, trois valeurs de  $^3J_{\text{H1}'\text{-H2}'}$  retrouvées dans le HCCH E.COSY et le DQF-COSY (figure 20) correspondent à un état intermédiaire entre la conformation C2'-endo et C3'-endo. La première valeur appartient au C26, mais il ne faut pas en tenir compte puisqu'elle est due au fait que cette paire de bases n'est pas très stable. La deuxième valeur appartient au A8 et la troisième valeur appartient soit à C7 ou à A11. Il est cependant difficile de discriminer à quel nucléotide ce signal appartient puisque leurs déplacements chimiques dans les dimensions du proton et du carbone sont dégénérés pour le H1' et le H2'. La conformation du ribose des résidus C7, A8 et A11 n'a donc pas été contrainte lors du calcul des structures.



**Figure 20 : Région des riboses du spectre DQF-COSY acquis à 25 °C sur l'ARN SLVI.** Les corrélations qui ont une valeur de  $^3J_{H1'-H2'}$  faible ne produisent pas de signal, alors que celles qui ont une valeur élevée produisent un signal intense. La corrélation peut être forte ( $^3J_{H1'-H2'} = 10$  Hz), faible ( $^3J_{H1'-H2'} = 0$  Hz) ou entre les deux (valeur intermédiaire). Les trois corrélations identifiées ont une valeur intermédiaire.

### 3.3.3 Protons non-échangeables des bases

Les bases des acides nucléiques comportent plusieurs protons non-échangeables qui sont très importants pour le calcul structural. Ces protons incluent le H2 des adénines, le H8 des guanines et des adénines, ainsi que le H5 et le H6 des cytosines et uridines. En effet, ces protons sont responsables de plusieurs NOEs inter-résiduels qui aident à définir la forme de l'hélice et l'empilement des bases. Les protons non-échangeables présents sur les diverses bases, ainsi que leurs fréquences dans la dimension du carbone, ont donc été attribués à l'aide du spectre 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY en utilisant la marche séquentielle. Cette méthode est basée sur le principe que certains NOEs intra et inter-nucléotides sont généralement observés dans un ARN en hélice de type A. Ces NOEs peuvent aussi être

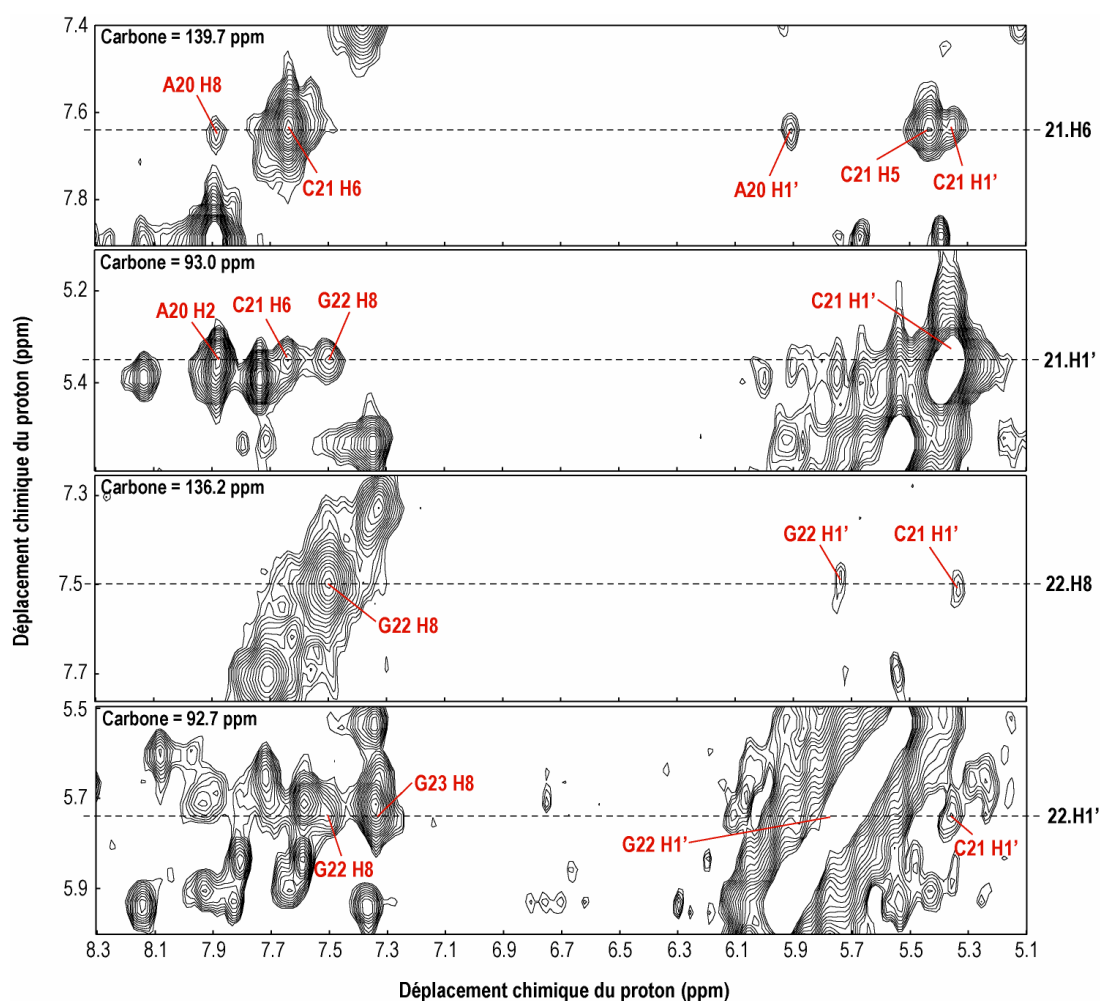
observés dans les régions non hélicales, mais avec certaines différences tout dépendant de la conformation adoptée par l'ARN. L'utilisation de ces NOEs séquentiels permet donc d'identifier les protons non-échangeables H8/H6 et H1' qui appartiennent au même résidu, ainsi que ceux qui appartiennent aux résidus précédents et subséquents. Avec les ARNs de petite taille (< 20 nt), il est possible d'utiliser un 2D NOESY acquis dans 100% D<sub>2</sub>O, mais dans le cas de l'ARN SLVI ce n'est pas suffisant, puisque plusieurs fréquences sont superposées dans la dimension du proton. Il est alors nécessaire de séparer ces signaux sur une troisième dimension, qui est obtenue par le <sup>13</sup>C, afin de distinguer l'identité de chaque signal.

La marche séquentielle permet de relier le proton H8/H6 du nucléotide (n) à son H1' et au H1' du résidu précédent (n-1). En observant la fréquence du H1' du résidu (n) à la fréquence du C1' (n), il est ensuite possible d'identifier les corrélations correspondant au signal du H6/H8 du résidu (n), ainsi que celui du résidu suivant (n+1). Cette technique permet donc de relier les différents nucléotides par l'intermédiaire de NOEs intra et inter-résiduels. Il faut alors partir d'un point qui est unique ou facilement identifiable dans la séquence et faire la marche séquentielle du début à la fin de l'ARN. La figure 21 montre un exemple de la marche séquentielle entre les résidus C21 et G22.

La marche débute en positionnant le spectre à la fréquence du H6 de C21 (7.64 ppm) dans la dimension du proton et au C6 de C21 (139.7 ppm) dans la dimension du carbone. Les signaux hors de la diagonale observés dans le premier panneau permettent alors d'identifier le déplacement chimique dans le proton du H1' de C21 (5.35 ppm) et du H1' du résidu précédent, soit A20 (5.93 ppm). Pour identifier la fréquence du carbone C1' de C21, on cherchera un signal à 5.35 ppm qui exhibe une corrélation au H6 de C21 dans la dimension du carbone et qui est localisé dans la région des C1'. En repositionnant le spectre à la fréquence du C1' de C21 (93.0 ppm) dans le carbone et au H1' de C21 (5.35 ppm) dans le proton, il est possible d'observer dans le deuxième panneau d'autres résonances qui correspondent aux fréquences du H8 du nucléotide suivant G22 (7.50 ppm) et du H6 de C21 (7.64 ppm). Suite à l'identification du déplacement chimique du H8 et du C8 de G22, la marche se poursuit dans le panneau trois en positionnant le spectre aux fréquences dans le proton du H8 (7.50 ppm) et dans le carbone du C8 (136.2 ppm). Les signaux hors de la



diagonale qui sont présents permettent de confirmer la résonance appartenant au H1' du nucléotide précédent (C21), ainsi que d'identifier la fréquence dans le proton du H1' de G22 (5.74 ppm). Cette attribution est confirmée dans le quatrième panneau où l'on voit le spectre à la fréquence du H1' de G22 dans la dimension du proton et à la fréquence du C1' de G22 dans la dimension du carbone. La fréquence de la résonance H8 appartenant au résidu suivant, G23 (7.33 ppm), est aussi visible sur ce plan du spectre. La marche séquentielle se poursuit ainsi de suite avec les autres nucléotides pour relier tous les protons H1' et H8/H6 de l'ARN SLVI.



**Figure 21 : Exemple de la marche séquentielle entre deux nucléotides consécutifs.** Les différents plans dans la dimension du carbone qui sont présentés dans cette figure proviennent d'un 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY acquis à 25 °C avec un temps de mixage de 160 ms sur un échantillon de l'ARN SLVI marqué en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ . Le plan du carbone est indiqué en noir dans le haut à gauche pour chaque panneau et les NOEs utiles pour la marche séquentielle sont indiqués en rouge. Le panneau du haut présente la région du spectre à la

fréquence du H6 de C21. Le deuxième panneau montre la région du spectre correspondant au H1' du résidu C21. Le troisième panneau montre la région du spectre à la fréquence du H8 de G22 et le quatrième panneau montre la région du spectre correspondant à son H1'.

Durant la marche séquentielle, il est aussi possible d'identifier la fréquence des H5 présents sur les uridines et les cytidines, ainsi que la fréquence des H2 présents sur les adénines. Ainsi, cette méthode permet de relier les systèmes de spin des riboses identifiés précédemment à leurs protons non-échangeables sur les bases azotées. Dans les cas les plus ambigus, des expériences supplémentaires, telle que le spectre 2D ( $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ ) MQ-(HC)N(C)H, peuvent être utilisées afin de confirmer la corrélation entre le H1' et le H6/H8 qui appartiennent au même résidu.

Suite à l'identification des signaux non-échangeables avec la marche séquentielle, les différents spectres 3D  $^{13}\text{C}$ -edited HMQC-NOESY ont été analysés afin d'attribuer tous les NOEs présents. Cette attribution permet avant tout d'obtenir plusieurs contraintes de distances intra et inter-nucléotides qui sont utilisées pour le calcul des structures. Par ailleurs, l'étude comparative des NOEs (Wijmenga, Mooren et al. 1993) a été effectuée suite à l'analyse de ces spectres afin de restreindre les angles dièdres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ . Cette comparaison de l'intensité des NOEs permet donc de décrire plusieurs angles importants dans la structure de l'ARN et de formuler des contraintes structurales qui améliorent de façon significative la géométrie de l'hélice.

### 3.3.4 Corrélation des protons échangeables et non-échangeables

Suite à l'identification individuelle des protons échangeables et non-échangeables de chaque résidu, il est important de corréler les protons de ces deux groupes qui appartiennent au même résidu. Pour ce faire, des expériences spécifiques à chaque type de base ont été effectuées. En effet, le spectre 2D (H)N(C)-TOCSY-(C)H, qui est spécifique aux adénines, permet de relier la fréquence de l'azote contenant les protons échangeables, soit le N6, aux protons H2 et H8 du même résidu. Dans le cas des guanines, le 2D H(NC)-TOCSY-(C)H permet d'identifier le proton imino (H1) et le proton non-échangeable H8 qui appartiennent au même résidu. Dans le cas des uraciles, le spectre 2D H(NCCC)H permet d'identifier le proton

imino (H3) et le protons non-échangeable H6 qui sont localisés sur le même résidu. Finalement, le spectre 2D H(NCCC)H spécifique aux cytosines permet de relier les protons aminos H61 et H62 de chaque cytosine au proton non-échangeable H6 du même résidu. Mises ensembles, ces expériences permettent de corréler les groupes de protons échangeables et non-échangeables qui appartiennent à chaque résidu dans l'ARN SLVI.

La section présentée ici permet d'avoir une vue d'ensemble du processus d'attribution des signaux dans l'ARN en utilisant des méthodes homonucléaires et hétéronucléaires. Celui-ci n'est cependant pas exhaustif. Il résume uniquement les parties les plus importantes de l'attribution des signaux du fragment SLVI. Plusieurs revues récentes existent et décrivent de façon extensive les différentes étapes pour obtenir une attribution complète des ARNs étudiés par RMN (Roberts 1993; Furtig, Richter et al. 2003; Tzakos, Grace et al. 2006; Scott and Hennig 2008).

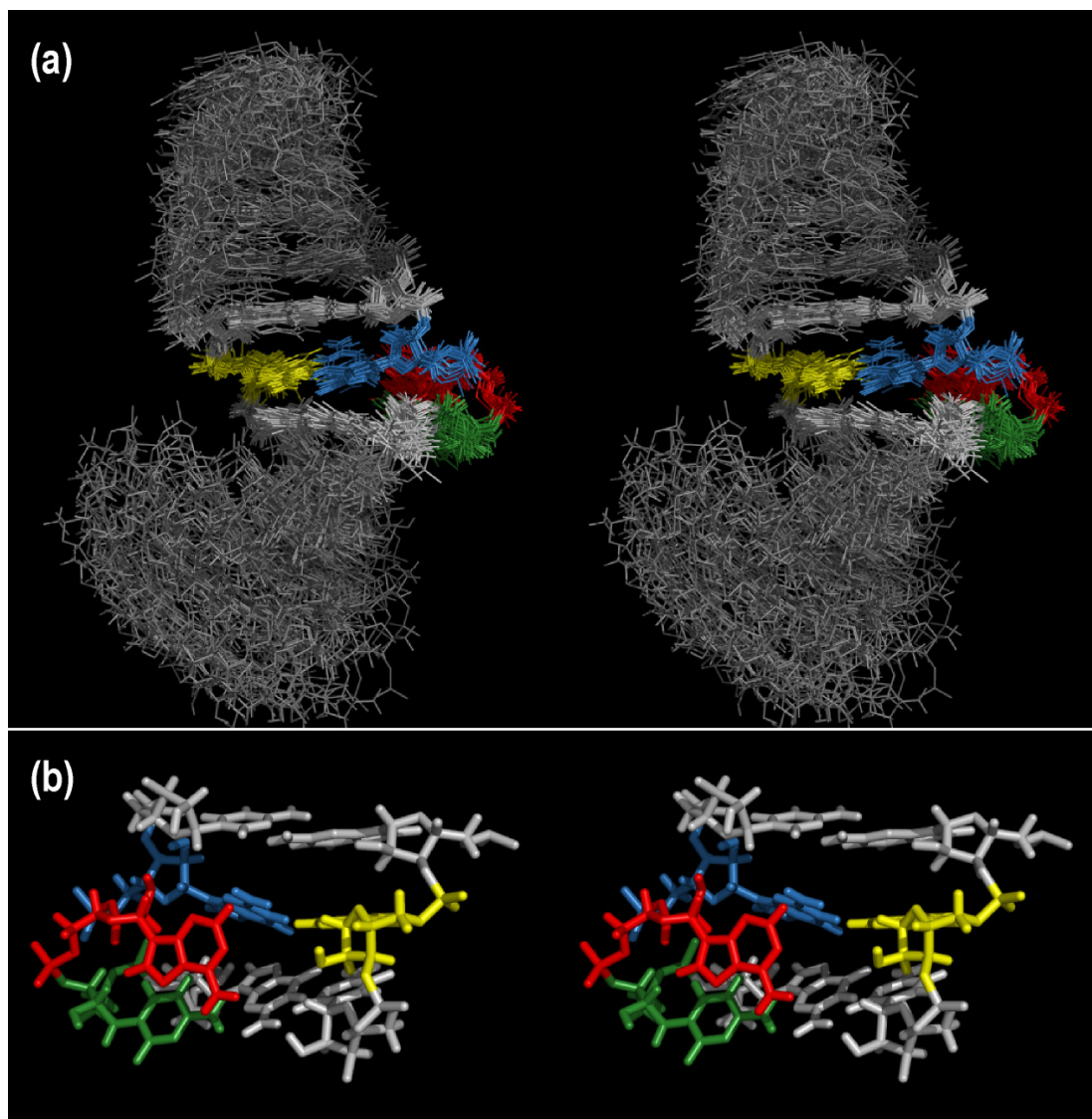
### **3.4 Structure de l'ARN SLVI**

#### **3.4.1 Calcul des structures**

L'analyse des spectres RMN précédemment décrite nous a permis d'extraire des contraintes de distances qui ont été utilisées pour calculer un ensemble de 50 structures à l'aide du programme X-PLOR-NIH version 2.0.6 (Brünger 1992). Parmi ces 50 structures, 33 satisfaisaient toutes les contraintes intégrées au calcul structural. Les 20 structures de plus basse énergie ont alors été sélectionnées, puis analysées, afin de caractériser la structure du domaine de la boucle A730. Le nombre et le type de contraintes utilisées pour calculer ces structures sont recensés dans le tableau I. La vue stéréo de l'ensemble de structures déterminées pour le fragment SVLI est montrée à la figure 22.

**Tableau I : Statistiques sur le calcul de la structure moyenne de l'ARN SLVI.**

<b>Contraintes de Distance</b>	
Nombre de contraintes de distance (NOE) provenant des protons non-échangeables.	889
Inter-nucléotides	489
Intra-nucléotide	400
Nombre de contraintes de distance (NOE) provenant des protons échangeables.	138
Contraintes pour former des ponts hydrogène	52
<b>Angles Dièdres</b>	
Conformation des riboses ( $\delta$ )	23
Squelette ribose-phosphate ( $\gamma$ )	13
<b>Nombre de Contraintes Total</b>	995
<b>Écart-type par Rapport à la Valeur Moyenne des Contraintes Expérimentales</b>	
NOE (Å) (aucun > 0.1 Å)	0.003 8 +/- 0.000 6
Dièdre (°) (aucun > 5°)	0.06 +/- 0.03
<b>Écart-type par Rapport à la Valeur Moyenne de la Géométrie Idéale</b>	
Liens (Å)	0.004 36 +/- 0.000 03
Angles (°)	1.010 +/- 0.002
Fautifs (°)	0.346 +/- 0.002
<b>Écart-type par Rapport à la Valeur Moyenne des Atomes Lourds dans la Structure Moyenne Minimisée (Å)</b>	
Général (résidus 2-25)	1.70 +/- 0.60
Tige 1 (résidus 2-5 et 22-25)	0.56 +/- 0.13
Tige 2 (résidus 11-18)	0.74 +/- 0.14
Boucle Interne (résidus 6-10 et 19-21)	0.84 +/- 0.19



**Figure 22 : Vue stéréo de la structure du fragment SLVI.** Les nucléotides hors du domaine de la boucle A730 sont colorés en gris alors que les deux paires de bases de chaque côté de la boucle (G754-C731 et C758-G729) sont en blanc. C7 (C755) est en vert, A8 (A756) en rouge, G9 (G757) en bleu et A20 (A730) en jaune. (a) Superposition au niveau de la boucle A730 des 20 structures de plus basse énergie obtenues lors du calcul structural. (b) Structure moyenne minimisée du domaine de la boucle A730.

### 3.4.2 Motifs présents dans l'ARN SLVI

La structure de l'ARN SLVI (figure 22(a)) adopte une conformation de type « hairpin ». Celle-ci est composée de deux tiges-boucles où la tige 1 comprend les résidus 1 à 5 et 22 à 26, alors que la tige 2 comprend les résidus 11 à 18. Celles-ci sont séparées par la boucle interne

qui contient le domaine du site actif. De plus, la tige 2 est fermée par une boucle GAAA. Les caractéristiques de chaque motif présent dans la structure de l'ARN SLVI sont détaillées ci-dessous.

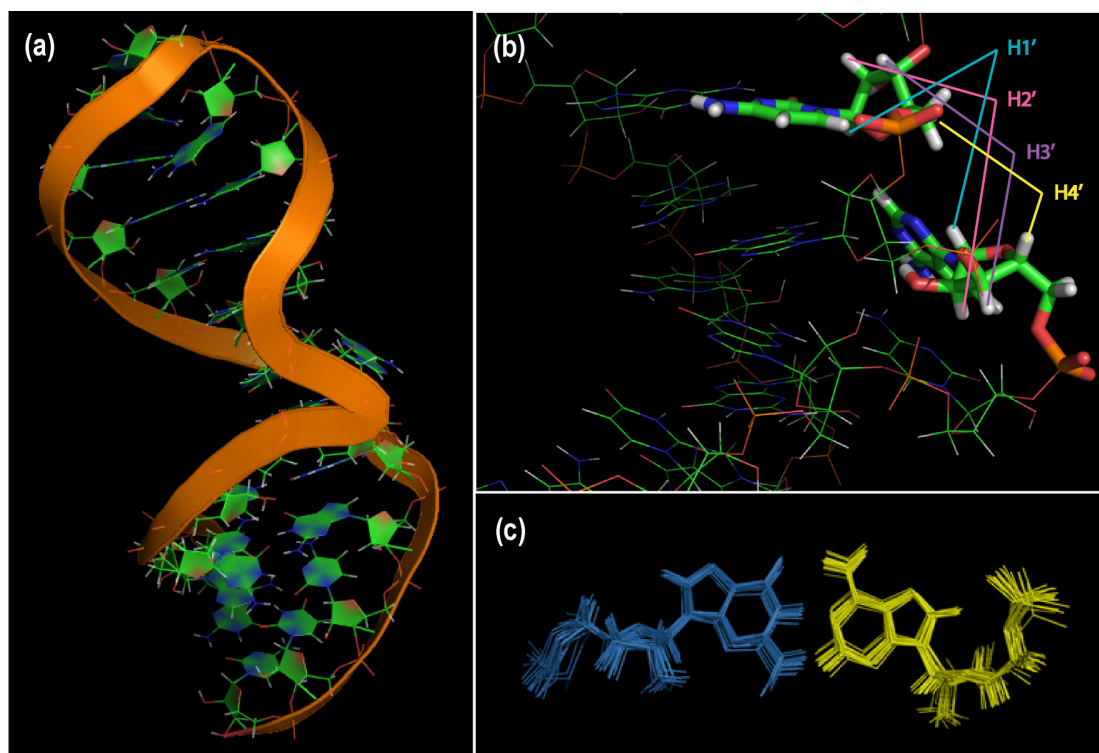
#### Boucle terminale

Tel que prévu initialement, la boucle GAAA se forme durant le calcul de structure. Elle appartient à la famille des boucles GNRA et contient toutes les caractéristiques des boucles GAAA (Jucker, Heus et al. 1996). En effet, le G13 est situé sur le brin en 5', alors que les résidus A14, A15 et A16 sont empilés les uns sur les autres sur le brin en 3'. L'angle glycosidique de tous ces résidus est en conformation *anti* et une paire de bases GA de type XI (Saenger 1984) se forme entre les résidus G13 et A16. La formation de boucles GNRA est fréquente dans l'ARN et ce type de motif est plutôt bien caractérisé (Jucker, Heus et al. 1996).

#### Domaine de la boucle A730

La partie la plus importante dans la structure de l'ARN SLVI est le domaine de la boucle A730, puisqu'il représente la structure du site actif dans le ribozyme VS. Ce domaine adopte une conformation particulière. En effet, la structure du squelette ribose-phosphate adopte une conformation qui est caractéristique d'un motif « S-turn » (Szewczak, Moore et al. 1993; Wimberly, Varani et al. 1993) entre les résidus G6 (G754) et C10 (C758). Le motif « S-turn » est présent dans plusieurs ARNs dont la boucle E de l'ARN 5S (Wimberly, Varani et al. 1993), la boucle sarcine-ricine (Correll, Wool et al. 1999), le site de liaison de eIF3 dans l'« IRES » du VHC (Collier, Gallego et al. 2002) et le ribozyme « hairpin » (Alam, Grum-Tokars et al. 2005). Ce motif est caractérisé par une déformation typique du squelette en forme de S (figure 23 (a)) et par une inversion de la conformation du ribose au point où le squelette tourne abruptement (figure 23(b)). En effet, dans une hélice de type A normale, les protons H1' et H4' du ribose pointent vers le bas, alors que les protons H2' et H3' pointent vers le haut. Dans le cas présent, le H1' et le H4' du A8 pointent vers le haut, alors que le H2' et le H3' pointent vers le bas. La conformation du ribose est donc inversée. Une autre caractéristique commune des « S-turn » est la présence de ribose(s) en conformation C2'-endo, ce qui est partiellement le

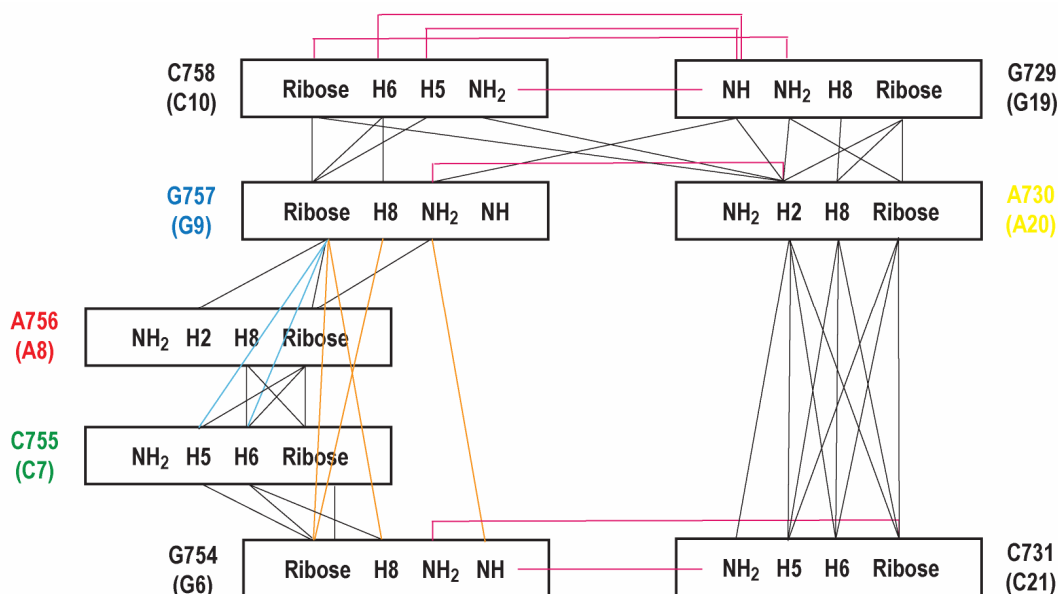
cas de A8 (A756) et possiblement C7 (C755), tel que décrit à la section 3.3.2. Par ailleurs, ce motif est aussi connu pour lier des ions magnésium (Alam, Grum-Tokars et al. 2005). L'impact de ce motif sur la structure globale de l'ARN SLVI et plus particulièrement sur le site actif est traité dans le chapitre suivant.



**Figure 23 : Caractéristiques de la boucle interne du fragment SLVI.** (a) Structure moyenne minimisée de l'ARN SLVI. Le ruban orange indique le squelette ribose-phosphate et une déformation en forme de S est visible au niveau du domaine de la boucle A730. (b) L'orientation du ribose de A8 (A756), qui est inversée, est comparée à celle du résidu C10 (C755), qui représente l'orientation normale dans une hélice de type A. (c) Superposition de la paire de bases G9-A20 (G757-A730) présente dans les 20 structures de plus basse énergie. Le G9 est coloré en bleu, alors que le A20 est en jaune.

En plus du motif « S-turn », le domaine de la boucle A730 contient une paire de bases G9-A20 symétrique (G757-A730) qui n'a pas été identifiée par les études biochimiques précédentes. Cette paire de bases non-canonique est empilée sous la paire de bases C10-G19 (C758-G729) et formée par deux ponts hydrogène localisés respectivement entre les atomes N1 et H61 du A20 et les atomes H1 et O6 du G9 (figure 23 (c)). Elle sert principalement à stabiliser et élargir le sillon majeur de la boucle interne pour permettre la formation du motif « S-turn ». En effet, la distance entre les H1' de la paire de bases G9-A20

(type VII, Saenger) est plus grande que dans une paire de bases Watson-Crick, ce qui élargit la distance entre les deux brins de la boucle interne. Un autre élément intrigant dans la boucle est la présence de deux nucléotides non pairés sur le brin 5', soit le C7 (C755) et le A8 (A756). Ces deux nucléotides sont empilés l'un sur l'autre, tel que décrit par les NOEs qui les relient (figure 24). Les protons aminos du A8 et du C7 ne donnent aucun NOEs aux autres nucléotides, ce qui est compatible avec la structure moyenne. En effet, ces deux nucléotides sont exclus de l'hélice et leur face Watson-Crick est exposée dans le sillon mineur (figure 22). La face Watson-Crick de ces résidus est alors accessible pour former des interactions tertiaires avec le reste du ribozyme. Finalement, les NOEs entre le G6 (G754) et le G9 (G757), ainsi que les NOEs entre le C7 (C755) et le G9 (G757) sont très importants pour plusieurs raisons (figure 24). Premièrement, ils permettent de définir la formation du motif « S-turn », et deuxièmement, ils induisent une courbure dans l'ARN SLVI pour compenser la présence de deux nucléotides supplémentaires sur le brin 5'. Quant aux nucléotides G19 à C21, qui sont sur le brin en 3', ils sont empilés les uns sur les autres comme dans une hélice de type A.



**Figure 24 : Schéma des NOEs identifiés dans le domaine de la boucle A730 de l'ARN SLVI.** La mention ribose dans ce schéma inclut les protons H1', H2', H3', H4', H5' et H5''. Elle a été utilisée pour simplifier le diagramme. Les nucléotides **C7 (C755)**, **A8 (A756)**, **G9 (G757)** et **A20 (A730)** sont colorés tels que dans les figures 22 et 23, qui illustrent les différents



aspects de la structure. Les lignes pleines noires indiquent les NOEs entre des nt successifs, alors que les lignes roses montrent les NOEs entre les nt qui forment des paires de bases. Les traits oranges démontrent les NOEs présents entre les nt G6 et G9 (G754 et G757), alors que les traits bleu pâle indiquent ceux formés entre les nt C7 et G9 (C755 et G757).

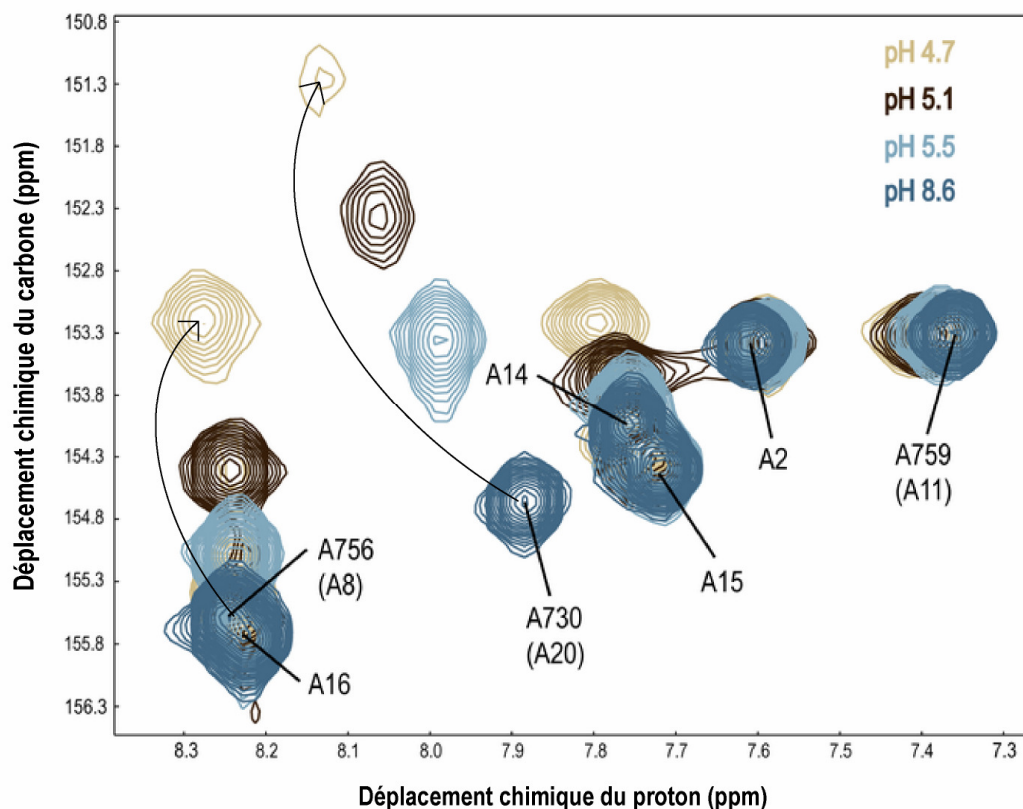
Les motifs structuraux mentionnés ci-dessus caractérisent la structure du domaine de la boucle A730. Leur importance, ainsi que le rôle qu'ils jouent au niveau structural ou mécanistique seront discutés en détails dans le chapitre suivant.

### 3.5 PKa des Adénines dans la Boucle Interne

Il a été proposé récemment que l'adénine A756 joue un rôle important dans le clivage du lien phosphodiester en agissant comme acide ou base dans un mécanisme de catalyse par acide/base générale. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons utilisé la RMN du carbone-13 sur le fragment SLVI pour vérifier si le A8 (A756) possède un pKa modifié. Cette méthode consiste à changer le pH d'un échantillon marqué en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  et à observer le déplacement chimique, dans la dimension du carbone, de certains atomes qui sont fortement influencés par la protonation des différentes bases. Dans le cas des adénines, la protonation a lieu sur le N1. Il y a donc deux atomes de carbone qui sont affectés de façon significative lors de la variation du pH, soit le C2 et le C6, puisqu'ils sont localisés à proximité du site d'ionisation. Dans les expériences présentées à la figure 25, nous avons suivi le déplacement chimique du C2 pour plusieurs raisons. Premièrement, il est facile de détecter les carbones C2 à l'aide du spectre 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, alors qu'il est plus difficile de détecter le C6, car il n'est pas lié à un proton. De plus, la région des carbones C2 dans ce spectre est distincte et bien résolue, ce qui en facilite l'analyse. Le carbone C2 est aussi le carbone dont le déplacement chimique varie le plus en fonction du pH dans ce type de titrage, ce qui facilite la mesure des pKas.

La figure 25 démontre que le fragment SLVI possède deux adénines ayant un pKa modifié. En effet, on observe qu'en diminuant le pH, le déplacement chimique dans la dimension du carbone des signaux à 7.88 et 8.23 ppm change vers pH 5,6. Ces deux signaux

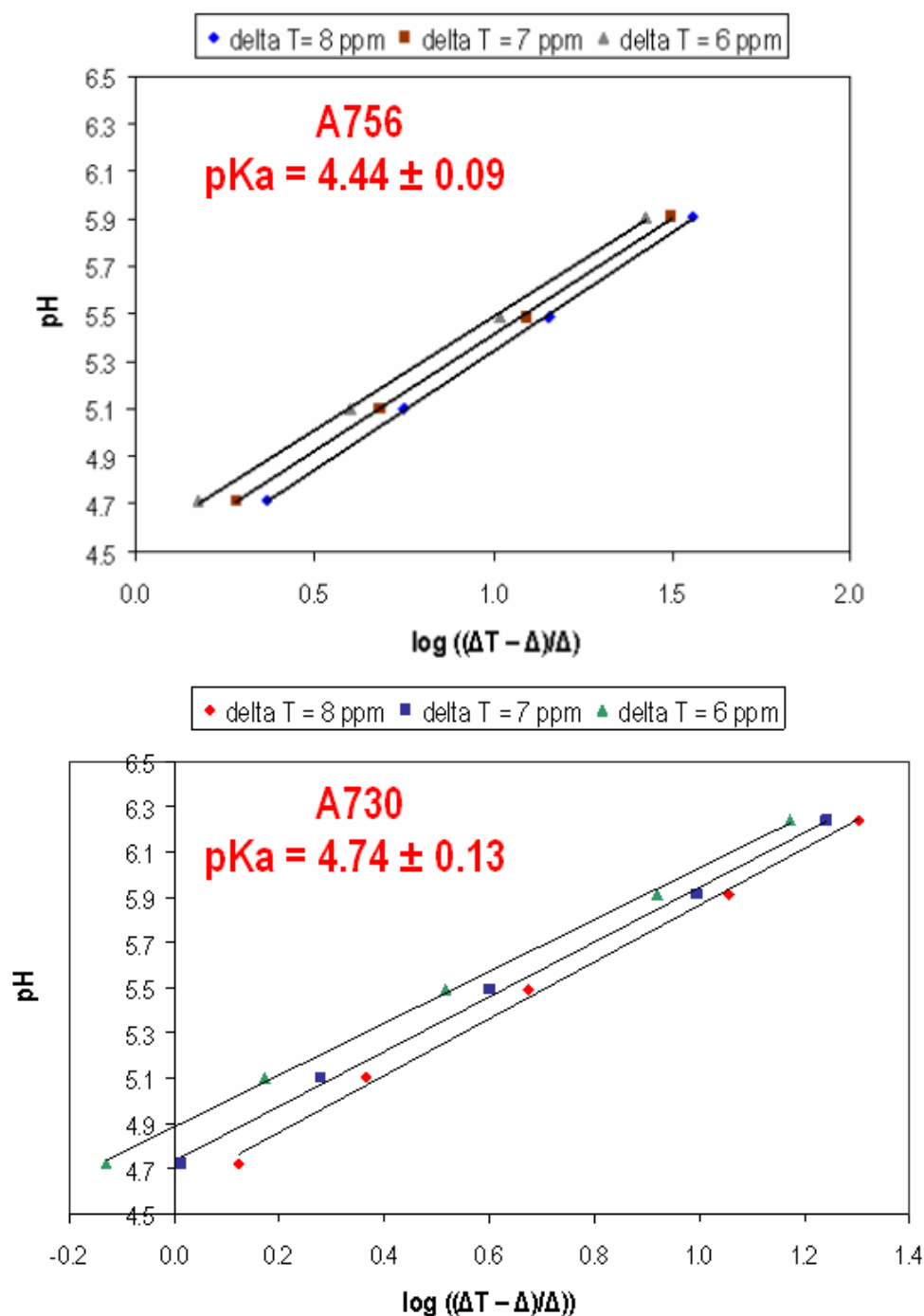
appartiennent respectivement aux H2 de A20 et de A8. Ces deux adénines sont situées dans le domaine de la boucle A730. Les autres adénines présentes dans le spectre appartiennent soit à des paires de bases A-U, soit à la boucle GAAA. Étant donné que leur déplacement chimique varie peu en fonction du pH, cela indique qu'elles ont un pKa similaire ou moindre à l'AMP en solution, soit 3.9 (Saenger 1984).



**Figure 25 : Titration du pH de l'ARN SLVI marqué en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  pour démontrer la présence de pKa modifiés.** Les régions aromatiques C2-H2 provenant de quatre  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC acquis à 25°C à divers pH ont été superposées afin de suivre le déplacement chimique des C2 et H2 en fonction du pH.

À l'aide de l'équation de Henderson-Hasselbalch ( $\text{pH} = \log \left( \frac{\Delta T - \Delta}{\Delta} \right) + \text{pKa}$ ), il est généralement possible de calculer le pKa des adénines qui ont un pKa modifié. Dans cette équation,  $\Delta T$  représente le changement total dans le déplacement chimique du C2 entre les états protonés et non-protonés pour un résidu donné, alors que  $\Delta$  représente la variation observée pour le déplacement chimique du C2 à un pH donné. Il suffit donc de comparer le déplacement chimique dans la dimension du carbone de ces adénines à divers pH avec le

déplacement chimique observé lorsque l'adénine est entièrement sous sa forme protonée. Le déplacement chimique maximal observé dans la dimension du carbone est respectivement de 3.66 ppm pour le A20 et de 2.52 ppm pour le A8. Cependant, ces valeurs ne correspondent pas aux adénines sous leur forme entièrement protonée, puisqu'il fut impossible d'atteindre cet état durant le titrage. En effet, nous avons constaté la formation d'un précipité dans l'échantillon avant la fin du titrage (pH = 4.3), car à bas pH la structure de l'ARN SLVI devient entièrement dénaturée. Il est donc difficile de calculer exactement le pKa des adénines A20 et A8. Afin d'obtenir une valeur approximative pour le pKa de ces deux adénines, la valeur de  $\Delta T$  maximale a été estimée entre 6 et 8 ppm, selon les valeurs recensées dans la littérature. 8 ppm correspond au déplacement maximal observé pour l'AMP en solution (Legault and Pardi 1994), alors que 6 ppm correspond au déplacement minimal retrouvé dans un ARN replié (Smith and Nikonowicz 1998). À l'aide cette estimation, nous avons établi que le A20 (A730) possède un pKa modifié de  $4.74 \pm 0.13$ , alors que le A8 (A756) a un pKa de  $4.44 \pm 0.09$  (figure 26).



**Figure 26 : Représentation graphique de l'équation de Henderson-Hasselbalch à différents pH pour les adénines ayant un pKa modifié dans le fragment SLVI. L'équation de Henderson-Hasselbalch pour une protonation unique est décrite par la relation suivante :  $\text{pH} = \log ((\Delta T - \Delta) / \Delta) + \text{pKa}$ , où  $\Delta T$  représente le changement total dans le déplacement chimique du C2 entre les états protonés et non-protonés. Cette valeur a été estimée entre 6 et**

8 ppm selon les valeurs recensées dans la littérature.  $\Delta$  représente la variation observée pour le déplacement chimique du C2 à un pH donné.

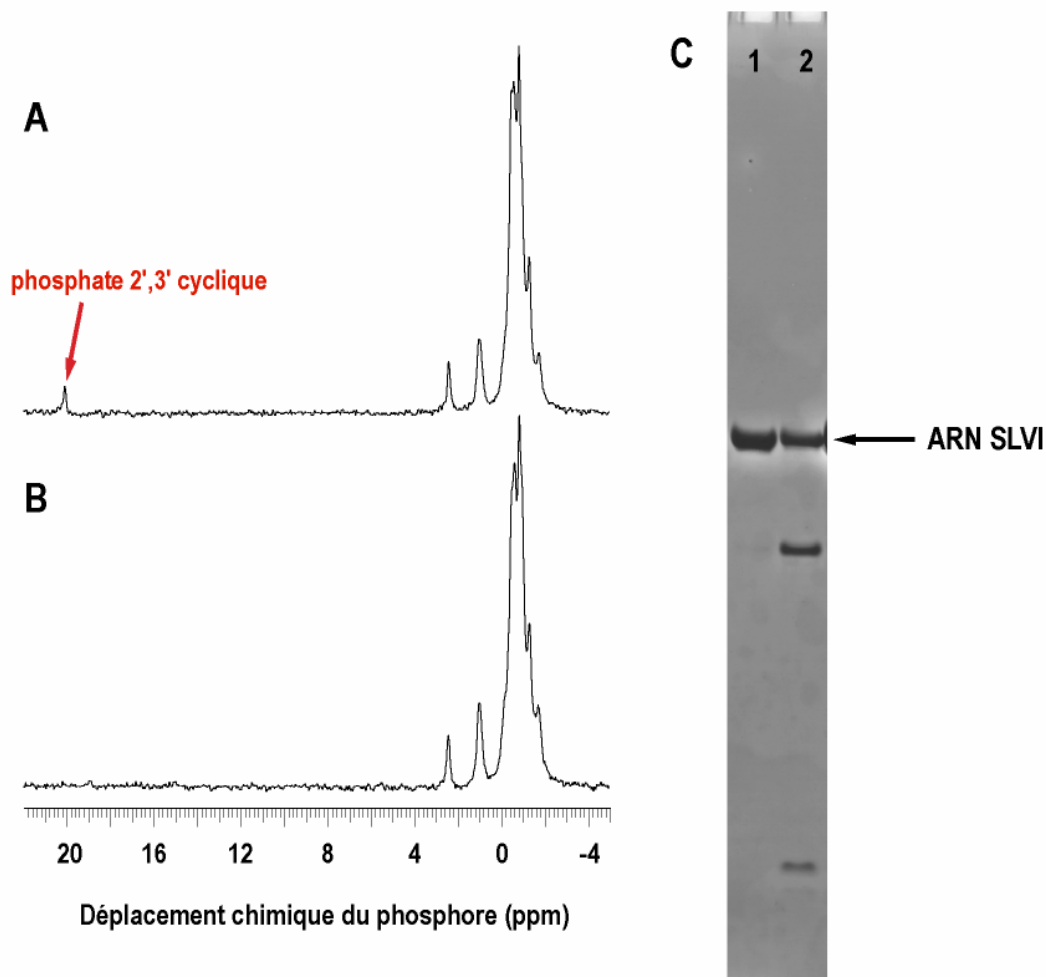
Les adénines A20 et A8 possèdent respectivement des pKa de 4.74 et de 4.44. Ces valeurs sont plus rapprochées du pH physiologique que celui de l'AMP en solution, qui est d'environ 3.9 (Saenger 1984). Au pH utilisé pour les études structurales (pH = 6.5), il y aura respectivement 1.76 % et 0.87% des adénines qui seront protonées pour le A20 et le A8. Le pourcentage de la population des adénines qui seront protonées est donc faible. Bien que le pKa de ces deux adénines ne corresponde pas exactement à ce qui était attendu (pKa = 5.2 - 5.8) (Jones and Strobel 2003; Smith and Collins 2007; Wilson, McLeod et al. 2007), leur présence supporte quand même le mécanisme proposé qui sous-tend une catalyse par acide/base général dans le ribozyme VS. Le rôle du A8 (A756) et du A20 (A730) dans cette réaction sera discuté plus en détail dans le chapitre suivant.

### 3.6 Clivage du Fragment SLVI

Suite aux études de RMN, nous avons observé que les échantillons contenant le fragment SLVI à haute concentration s'autoclivent. En effet, le dépôt de plusieurs échantillons sur gels dénaturants a permis de déterminer qu'il s'agit d'un clivage spécifique de l'ARN et non de dégradation de l'échantillon (figure 27 (c)). Afin de vérifier la pertinence de la structure tridimensionnelle obtenue, tous les échantillons qui ont été utilisés pour collecter des données RMN ont été analysés par gels dénaturants. Les échantillons ayant un niveau de clivage supérieur à 10% ont été identifiés et les expériences de RMN ont été acquises avec un nouvel échantillon non clivé afin de ne pas affecter la structure du site actif. Le clivage observé sur ces gels indiquent que l'ARN SLVI retient une activité catalytique même s'il est séparé du reste du ribozyme. Nous avons donc tenté de déterminer la localisation exacte du site de clivage dans l'ARN SLVI et le type d'extrémités produites lors de cette réaction.

À l'aide de la RMN du  $^{31}\text{P}$ , nous avons réussi à déterminer que le fragment SLVI est clivé et forme un produit contenant une extrémité avec un phosphate 2',3' cyclique. Tel que montré à la figure 27, un signal distinct est présent à 20 ppm dans le spectre du phosphore de

l'ARN partiellement clivé, alors que ce signal est absent dans le spectre de l'ARN non-clivé. Il a été démontré dans la littérature que ce signal est typique de la présence d'un phosphate 2',3' cyclique (Cozzzone and Jardetzky 1977; Thompson, Venegas et al. 1994). Le clivage de l'ARN SLVI s'effectue donc probablement par une réaction de transestérification et produit deux extrémités : soit un phosphate 2',3' cyclique et un 5'-OH.



**Figure 27 : Spectre 1D du phosphore acquis sur le fragment SLVI.** Les deux spectres ont été acquis à 25 °C sur des échantillons de l'ARN SLVI qui sont marqués en <sup>15</sup>N. **A)** Spectre obtenu avec un échantillon de l'ARN SLVI partiellement clivé. **B)** Spectre obtenu avec un échantillon de l'ARN SLVI non clivé. **C)** Gel dénaturant contenant 5 ug des échantillons non clivé (1) et clivé (2) de l'ARN SLVI. Le puit 2 contient deux bandes spécifiques en bas de l'ARN SLVI qui correspondent aux produits du clivage.

Les études de RMN (résultats non montrés) semblent indiquer que le clivage a lieu dans la boucle interne du fragment SLVI. En effet, certains signaux présents dans la boucle

interne deviennent plus larges et moins intenses dans les échantillons partiellement clivés. De plus, des études enzymatiques utilisant la ribonucléase T1 et la digestion en milieu alcalin sont en cours afin de déterminer le site exact du clivage de l'ARN SLVI. Des études de cinétiques sont aussi en cours pour vérifier si ce clivage fonctionne par une réaction bi-moléculaire où une molécule d'ARN SLVI servirait d'enzyme et une deuxième de substrat. Ceci confirmerait que le fragment SLVI conserve une activité enzymatique par lui-même, malgré le fait qu'il est isolé du reste du ribozyme. Dans le cas où cette hypothèse est vérifiée, ces études enzymatiques permettront de valider l'utilisation du fragment SLVI pour approfondir nos connaissances sur le site actif du ribozyme VS de *Neurospora*.

## Chapitre 4 : Discussion

### **4.1 Pertinence de la Structure du Site Actif**

La structure de l'ARN SLVI ayant été déterminée, il est essentiel de vérifier la pertinence de la structure obtenue. En effet, le but des travaux présentés dans ce mémoire est d'obtenir de l'information sur la structure du site actif du ribozyme VS en utilisant un fragment qui contient le domaine de la boucle A730. Il est donc important que la structure obtenue soit comparée aux données biochimiques établies précédemment afin de s'assurer que la structure du fragment est représentative de la structure du site actif dans le contexte du ribozyme entier.

#### **4.1.1 Comparaison avec les études de protection / déprotection chimiques**

La structure secondaire du ribozyme VS qui est présentée à la figure 2 a été déterminée par l'analyse de modifications chimiques effectuées sur le ribozyme VS en présence du substrat (Beattie, Olive et al. 1995). Ces altérations de la structure incluent les modifications au DEPC, au KE, au DMS et au CMTc. Les études publiées dans cet article ont été réalisées dans des conditions qui supportent la catalyse en présence de magnésium (conformation native) ou en absence de magnésium (conformation semi-dénaturée). Les études spectroscopiques effectuées sur le fragment SLVI devraient donc être généralement en accord avec ces études de protection et déprotection chimiques.

Les modifications au DEPC permettent d'identifier la présence d'interactions secondaires ou tertiaires, car la présence de cet agent réagit avec la position N7 des adénines en général, sauf lorsqu'elles sont empilées dans une hélice ou lorsqu'elles forment des interactions tertiaires (Ehresmann, Baudin et al. 1987). Le domaine de la boucle A730 dans l'ARN SLVI contient trois adénines qui sont présentes dans le ribozyme natif, soit A20 (A730), A8 (A756) et A11 (A759). Suites aux modifications avec le DEPC, dans des conditions natives et semi-dénaturées, les résidus A730 et A759 sont protégés, alors que le A756 est seulement



partiellement protégé. Ces résultats sont en accord avec la structure obtenue pour l'ARN SLVI. En effet, il est normal que la position N7 du A11 (A759) soit protégée, car ce résidu forme une paire de bases Watson-Crick avec le U18 (U728), qui est empilée dans la tige. Quant au A20 (A730), il forme une paire de bases G-A symétrique de type VIII et tel qu'indiqué par les NOEs dans le schéma à la figure 24, ce résidu est empilé entre les résidus G19 (G729) et C21 (C731). Il est donc tout à fait normal que la position du N7 soit protégée du DEPC. La formation de la paire de bases G757-A730 semble cependant dépendre de la présence d'ions magnésium, puisque le N7 du A730 est réactif en absence de cet ion. Cette conclusion est aussi supportée par le patron des protons iminos montré à la figure 15. En effet, la formation de la boucle interne est déstabilisée en absence de magnésium. Dans le cas du A756, le N7 est exposé dans le sillon mineur de la structure de l'ARN SLVI. Il devrait donc être accessible pour la modification par le DEPC, mais il semble partiellement protégé. Ce résultat peut être dû à plusieurs facteurs, dont la formation d'interactions tertiaires avec une autre région du ribozyme, l'empilement partiel du A756 avec le C755 ou encore, à cause de la liaison d'ions magnésiums à cet endroit. Toutes ces raisons sont possibles et des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer ce phénomène plus en détails.

Des modifications avec le KE et le CMCT ont aussi été effectuées pour vérifier la formation de paires de bases Watson-Crick chez les guanines et les uridines. Les modifications par le KE affectent les positions N1 et N2 des guanines, alors que le CMCT affecte la position N1 des guanines et la position N3 des uridines (Beattie, Olive et al. 1995). Le domaine de la boucle A730 dans l'ARN SLVI contient quatre guanines qui sont présentes dans le ribozyme natif, soit G19 (G729), G22 (G732), G6 (G754) et G9 (G757), ainsi que deux uridines, soit U18 (U728) et U5 (U753). Suite aux modifications avec le KE et le CMCT, les résidus G729 et G732 sont protégés, tel qu'attendu. En effet, ces deux guanines forment des paires de bases stables en présence de magnésium, soit une pb Watson-Crick G-C pour le G729 et une paire de bases G-U wobble (type XXVIII, (Saenger 1984)) pour le G732. Il est cependant important de mentionner ici que comme la paire de bases G757-A730, les études de modifications chimiques indiquent que la paire de bases C758-G729 ne se forme pas en absence de magnésium. Ceci est probablement dû à l'instabilité du domaine de la boucle A730 en absence de magnésium et est compatible avec nos études de RMN puisque cette pb

semble être stabilisée par le magnésium. Le cas des G754 et G757 est plus complexe, car les paires de bases qu'ils forment sont légèrement instables, tel qu'indiqué par les études de RMN (section 3.2 et 3.3). Les résultats obtenus par les modifications chimiques sont aussi ambigus. Dans les deux cas, les bases sont déprotégées lorsqu'elles sont exposées au KE et partiellement protégées lorsqu'elles sont exposées au CMCT. Ces résultats sont cependant consistants avec la structure du fragment SLVI. En effet, ces deux paires de bases sont aux extrémités de la boucle interne A730 et les études de RMN ont démontré que leurs protons iminos étaient en échange rapide avec le solvant. Ce résultat n'est donc pas surprenant puisque ces paires de bases sont instables.

Quant aux deux uridines présentes dans l'ARN SLVI, elles sont protégées au niveau du N3 lors des modifications au CMCT. Ceci est consistant avec la structure de l'ARN SLVI, car elles forment des paires de bases stables, soit une pb Watson-Crick A-U pour le U728 et une pb G-U wobble pour le U753. Le U728 semble légèrement réactif en absence de magnésium. Ceci indique donc que la présence de magnésium augmente la stabilité de cette paire de base. Ces observations sont en accord avec les études de RMN présentées à la figure 15.

Des modifications avec le DMS ont aussi été effectuées afin de vérifier la formation de paires de bases Watson-Crick chez les adénines et les cytosines. Les modifications par le DMS affectent la position N1 des adénines et la position N3 des cytosines (Beattie, Olive et al. 1995). Le domaine de la boucle A730 dans l'ARN SLVI contient trois adénines, ainsi que trois cytosines qui sont présentes dans le ribozyme natif, soit A20 (A730), A8 (A756) et A11 (A759), ainsi que C21 (C731), C7 (C755) et C10 (C758). Suite aux modifications avec le DMS, les résidus A730 et A759 sont principalement protégés des modifications chimiques. En effet, ces deux adénines forment des paires de bases qui sont relativement stables en présence de magnésium dans la structure de l'ARN SLVI, soit une pb G9-A20 de type VIII (Saenger 1984) et une pb A11-U18 Watson-Crick. En absence de magnésium, ces deux adénines deviennent plus exposées au DMS, car elles les pb qu'elles forment deviennent instables. Quant au C731 et au C758, ils sont tous deux principalement protégés des modifications chimiques en présence de magnésium et déprotégés en son absence. Ceci indique que les paires de bases

C758-G729 et G754-C731 sont formées en présence de cet ion. La stabilisation des pb G757-A730, C758-G729 et A759-U728 dépend donc de la présence d'ions magnésium, puisque le N1 de A730, le N3 de C758 et le N1 de A759 sont réactifs en absence d'ions divalents. Les résultats des études de protection / déprotection au DMS sont consistants avec la stabilisation par le magnésium des paires de bases G9-A20, C10-G19 et A11-U18 dans la structure de l'ARN SLVI, tel que démontré par les études de RMN à la figure 15. Quant aux résidus C755 et A756, ils sont affectés par le DMS en absence et en présence de magnésium. Ces résultats sont en accord avec la structure du fragment SLVI. En effet, dans la structure de SLVI ces deux nucléotides ne sont pas pairés et leur face Watson-Crick est exposée dans le sillon mineur. Elle est donc accessible pour être modifiée par cet agent.

En résumé, ces études de modifications chimiques (Beattie, Olive et al. 1995) semblent en accord avec la formation de paires de bases qui sont dépendantes de la présence de magnésium, tel que démontré dans la section 3.2. Ces études sont aussi consistantes avec la structure obtenue pour le fragment SLVI.

#### 4.1.2 Comparaison avec les études de mutagenèse

Les études de mutagenèse effectuées sur le domaine de la boucle A730 du ribozyme VS ont démontré que l'identité de plusieurs nucléotides dans la boucle interne A730 est très importante pour l'activité catalytique (Lafontaine, Wilson et al. 2001). Il est cependant difficile de corrélérer ces études de mutagenèse avec la structure du fragment SLVI. En effet, la substitution d'un nucléotide entraîne parfois une modification de la structure locale qui peut être difficile à prévoir. Néanmoins, il est possible d'expliquer certains de ces résultats.

Par exemple, la mutation du A730 par d'autres nt affecte l'activité catalytique à divers degrés en fonction de la base utilisée. La mutation qui affecte le moins l'activité catalytique est le remplacement par une cytosine et celle qui affecte le plus l'activité est la substitution par une guanine. Deux explications sont possibles pour ce phénomène. Premièrement, il semble que la formation de paires de bases avec une grande distance entre les H1' soit favorisée, sauf dans le cas de la guanosine, où la paire de bases ne se forme probablement pas. En

effet, la formation d'une paire de bases G-A est plus favorable que G-C, qui à son tour est plus favorable que la G-U. Ceci permet probablement d'accommoder la formation du « S-turn » en élargissant l'hélice au niveau de la paire de bases G-A. D'un autre côté, il est possible que la substitution par une cytosine soit mieux tolérée puisqu'elle a un pKa qui est plus proche de celui de l'adénine que la guanine ou l'uridine. Étant donné que le A20 (A730) possède un pKa modifié, cette explication est aussi plausible.

Les études de mutagenèse indiquent que la paire de bases G754-C731 est aussi importante pour l'activité catalytique (Lafontaine, Wilson et al. 2002). En effet, il semblerait que les mutations qui forment une paire de bases Watson-Crick à l'extrémité de la boucle interne affectent moins l'activité. La paire de bases G754-C731 peut donc être remplacée par une paire A-U, U-A ou C-G tout en conservant l'activité catalytique. Cependant, les mutations qui induisent la formation de paires de bases non-canoniques ou qui empêchent la formation de la paire de bases affectent significativement l'activité du ribozyme. Ces résultats sont en accord avec la structure de l'ARN SLVI, puisque la paire de bases G6-C21 (G754-C731) se forme à l'extrémité de la boucle interne (figure 22). Bien que cette paire de bases soit moins stable, elle est présente et importante pour la formation du motif « S-turn » dans la boucle A730. L'autre extrémité de la boucle est fermée par la paire de bases C10-G19 (C758-G729), tel que démontré dans la structure secondaire à la figure 2.

Les études de mutagenèse du C755 peuvent aussi être expliquées par la structure de l'ARN SLVI. En effet, la mutation d'une cytosine pour une adénine ou une uridine affecte très peu l'activité catalytique, mais la présence d'une guanine affecte significativement la réaction. Le C7 (C755) est « bulged » hors de l'hélice et exposé au solvant dans la structure de l'ARN SLVI (figure 21). Bien que sa face Watson-Crick soit exposée au solvant, ce nucléotide ne semble pas vraiment interagir avec d'autres parties du ribozyme (Wilson, McLeod et al. 2007). La substitution par une adénine ou une uridine n'affecte donc pas la structure car peut importe la géométrie du nucléotide, il se trouve à être exclus de l'hélice. Dans le cas d'une substitution par une guanine, il est possible que l'activité soit affectée par la formation d'une paire de bases avec le A730, ce qui déstabiliserait la formation du motif « S-turn » et affecterait le clivage.

Quant aux études de mutagenèse au niveau du G757, elles indiquent que la présence d'une purine est favorisée au lieu d'une pyrimidine. Ceci peut probablement s'expliquer par la distance entre les deux brins au niveau des bases G757 et A730. En effet, la distance entre les C1' d'une paire de bases GA symétrique est en moyenne de 12.5 Å. Si le G757 est remplacé par une adénine, une paire de bases AA symétrique peut alors se former et la distance entre les C1' est en moyenne de 12.3 Å, ce qui est similaire à la GA symétrique. Si cette guanine est remplacée par une pyrimidine, la distance entre les C1' devient plus petite, soit de 10.3 Å pour une paire de bases U-A et de 10.4 Å pour une paire de bases C-A. Il semble donc probable que la présence d'une purine soit favorisée afin d'élargir l'hélice et accommoder la présence du « S-turn ». D'un autre côté, il est possible que la présence d'une purine soit favorisée à cause de l'existence d'un site de liaison au magnésium. En effet, le N7 des guanines interagit souvent avec les ions magnésium hydratés. Étant donné qu'il y a au moins un site de liaison au magnésium à cet endroit, il est possible que la substitution de la guanine par une adénine soit favorisée puisque ces deux bases ont des géométries similaires et elles présentent toutes deux un N7 qui peut former un pont hydrogène avec une molécule de magnésium hydratée. La substitution par une pyrimidine serait alors défavorisée puisque cela déstabiliserait le site de liaison du magnésium.

Quant au A756, les études de mutagenèse ont clairement démontré que son identité est critique. La partie importante de ce nucléotide pour l'activité catalytique est la base (Lafontaine, Wilson et al. 2001); plus particulièrement la face Watson-Crick (Lafontaine, Wilson et al. 2002; Jones and Strobel 2003). En observant la structure du fragment SLVI (figure 22), il est évident que celle-ci est en accord avec les études de mutagenèse. Non seulement la base du A8 (A756) est exclue de l'hélice, mais sa face Watson-Crick est aussi exposée au solvant dans le sillon mineur. Cette base est donc très bien placée pour interagir avec d'autres parties du ribozyme, dont le site de clivage. La structure obtenue supporte donc le mécanisme réactionnel proposé dans lequel le A756 joue un rôle primordial.

#### 4.1.3 Importance des groupements 2'-OH

Selon les études de NAIM (Sood, Yekta et al. 2002) et de mutagénèse (Lafontaine, Wilson et al. 2001), le domaine de la boucle A730 présent dans l'ARN SLVI contient deux groupements 2'-OH (A756 et G754) qui sont importants pour l'activité catalytique. L'absence de ces groupements n'inhibe pas complètement la réaction, mais la ralentit de façon notable. En observant la structure du fragment SLVI, il est possible d'expliquer cette observation. En effet, un des groupements hydroxyles est probablement impliqué dans la formation d'un pont hydrogène qui stabilise le motif « S-turn ». Le 2'-OH du A8 (A756) interagit vraisemblablement avec l'atome O4' du C10 (C758), puisqu'ils sont situés à environ 2.7 Å l'un de l'autre dans la structure moyenne. Quant au groupement 2'-OH du G6 (G754), il ne semble pas positionné pour former des ponts hydrogène dans la tige-boucle VI. Il est cependant fort probable qu'il lie un ion magnésium ou qu'il interagisse avec d'autres parties du ribozyme VS, soit les tiges-boucles I ou II, durant le repliement du domaine catalytique ou lors de la reconnaissance du substrat. La présence de ces groupements hydroxyles n'est donc pas essentielle pour le mécanisme réactionnel, mais sert probablement à stabiliser certains motifs et/ou interactions dans le ribozyme VS.

#### 4.1.4 Corrélations entre la structure et les sites de liaison au magnésium

Tel que mentionné à la section 1.3.5, l'utilisation de phosphorothioates permet d'identifier les phosphates qui sont impliqués dans la liaison d'ions magnésium. L'ajout subséquent de manganèse permet également de déterminer si le magnésium interagit directement avec les phosphates affectés (coordination « inner sphere »). La substitution des phosphates par des phosphorothioates a donc permis d'identifier trois groupements phosphates importants pour l'activité catalytique qui sont présents dans la structure de l'ARN SLVI. Ces trois phosphates sont en 5' des nucléotides C755, G757 et C758 (Sood, Beattie et al. 1998). Étonnamment, ces phosphates font tous partie du motif « S-turn » et ils sont à proximité les uns des autres. Les groupements phosphates de G9 (G757) et C10 (C758) sont particulièrement proches dans l'espace et il est donc fort probable qu'ils lient le même ion magnésium. Par ailleurs, la présence d'un ou plusieurs ions magnésium le domaine de la

boucle A730 est consistante avec les études de RMN préliminaires (figure 15). En effet, ces études, ainsi que les modifications chimiques discutées dans la section 4.1.1 indiquent que la liaison d'un ou plusieurs ions divalents stabilise la formation de la paire de bases G9-A20 (G757-A730) et du motif « S-turn ». De surcroît, la déformation en forme de S dans le squelette ribose-phosphate occasionne une accumulation de charges négatives dans un endroit restreint, puisque plusieurs phosphates se retrouvent à proximité les uns des autres. Il est donc évident que la liaison d'ions magnésium à cet endroit va permettre de contrebalancer ce groupe de charges négatives et ce faisant, stabiliser le motif « S-turn ». Étant donné que l'inhibition créée par la présence de phosphorothioate aux nucléotides G757 et C758 peut être compensée par la présence de manganèse, cela indique que ces phosphates font une coordination de type « inner sphere » avec le magnésium.

À l'inverse des phosphates de G757 et G758, l'activité du phosphate de C755 ne peut pas être récupérée en présence de manganèse. Cela signifie donc que le phosphate du C755 lie, soit un ion magnésium hydraté par coordination « outer sphere », ou qu'il forme un pont hydrogène qui stabilise la structure. Selon la structure de l'ARN SLVI, les deux oxygènes liés au phosphate en 5' du C7 ne sont pas orientés pour former des ponts hydrogène, car ils sont exposés au solvant. Ceci semble donc favoriser la liaison d'un ion magnésium hydraté. Néanmoins, il faut considérer que les études avec les phosphorothioates ont été effectuées sur le ribozyme VS entier. Il est donc possible que le phosphate du C755 forme un pont hydrogène avec une autre partie du ribozyme, comme le substrat ou l'hélice II. Des études plus poussées sur la localisation exacte des ions métalliques dans le domaine de la boucle A730 devraient nous aider à répondre à cette question et à acquérir plus d'informations sur le rôle des ions métalliques dans la formation du « S-turn ».

## 4.2 Motif « S-turn »

Tel que mentionné précédemment, les motifs « S-turn » sont présents dans plusieurs ARN, mais il ne semble pas y avoir de motif consensus établi à ce jour. Par contre, il existe plusieurs caractéristiques qui décrivent ce motif et elles semblent toutes présentes dans la

boucle interne A730. Ces caractéristiques incluent entre autres, la présence d'une déformation en forme de S dans le squelette riboses-phosphates, une inversion de la conformation du ribose au point où le squelette tourne abruptement, des riboses en conformation C2'-endo pour les nucléotides exposés au solvant, ainsi qu'un patron de NOEs typique dans les spectres de RMN. En effet, ce motif est caractérisé par la présence de NOEs entre les résidus qui sont en hélice à chaque extrémité de la boucle (Collier, Gallego et al. 2002) (figure 24). Normalement, on constate aussi l'absence de certains NOEs typiques d'une région hélicale chez les nucléotides qui sont exposés au solvant. De plus, ce motif « S-turn » est aussi souvent fermé par au moins une paire de bases G-A, mais il ne semble pas y avoir de consensus sur le type G-A. Finalement, la présence de ce motif, qui est causé par une boucle asymétrique, induit une déformation locale dans l'hélice. Toutes ces caractéristiques sont présentes dans le motif « S-turn » qui est retrouvé dans le domaine de la boucle A730, mais il existe aussi certaines différences qui doivent être mentionnées. Selon la littérature, ce motif contient généralement un nucléotide - souvent une guanine - exposé au solvant. Dans le cas de l'ARN SLVI, deux nucléotides sont exposés au solvant; il s'agit d'une adénine et d'une cytosine. La présence de ces deux nucléotides « bulged » induit donc une courbure plus prononcée entre les deux hélices. Étant donné ces différences, il serait intéressant de vérifier, à l'aide d'outils bioinformatiques, si une séquence ou une structure similaire est présente chez d'autres ARNs.

Dans nos études de RMN de SLVI, le motif « S-turn » est formé à cause de plusieurs NOEs de faible intensité. Ceux-ci sont énumérés dans le tableau II. La plupart des NOEs retrouvés dans ce tableau sont typiques de ce motif. En effet, plusieurs NOEs entre les deux paires de bases G6-C21 et C10-G19 qui ferment la boucle sont généralement observés. Puisque le motif « S-turn » dans l'ARN SLVI contient un nucléotide supplémentaire comparativement au « G-bulge » typique, des NOEs entre le C7 et le G9 sont présents afin de stabiliser le motif (figure 24). Il faut aussi mentionner que certains NOEs qui devraient être intenses selon la structure, ne sont pas observés ou de faible intensité. En effet, plusieurs NOEs intenses devraient normalement être présents entre les riboses de A8 et C7, ainsi qu'entre les riboses de A8 et G9, car ils sont situés à moins de 4 Å. Certains des NOEs attendus ne sont cependant pas visibles par RMN et d'autres ne peuvent être identifiés avec



certitude du à la dégénérescence de certains signaux. Leur absence est probablement du au fait que le A8 (A756) a une dynamique qui est différente des autres résidus. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ceci, comme la liaison d'ions magnésium à son ribose ou encore l'échange conformationnel du ribose de A8 entre les états C2'-endo et C3'-endo.

**Tableau II : Liste des NOEs qui induisent la formation du « S-turn » dans l'ARN SLVI.**

NOEs	Distance
6.H1 - 9.H2#	1.8 – 7.0
6.H8 - 9.H1'	1.8 – 7.0
6.H1' - 9.H8	1.8 – 7.0
6.H1' - 9.H1'	1.8 – 7.0
6.H1' - 9.H8	1.8 – 7.0
6.H3' - 9.H2'	1.8 – 7.0
7.H5 - 8.H1'	1.8 – 7.0
7.H6 - 8.H2'	1.8 – 4.2
7.H6 - 9.H5'	1.8 – 7.0
7.H6 - 9.H5''	1.8 – 7.0
8.H1' – 9.H2#	1.8 – 7.0
8.H2' – 7.H5	1.8 – 7.0
9.H8 - 6.H2'	1.8 – 5.5
9.H8 - 6.H5'	1.8 – 5.5
9.H8 - 6.H5''	1.8 – 7.0
9.H1' - 7.H5	1.8 – 5.5
9.H4' – (6.H1' ou 7.H5)	1.8 – 7.0
9.H5'' - 6.H2'	1.8 – 7.0

Malgré le fait qu'il existe certaines différences entre les motifs « S-turn » qui sont recensés dans la littérature et celui présent dans l'ARN SLVI, celui-ci contient toutes les caractéristiques requises pour sa formation. De plus, ce motif est connu pour lier le magnésium et stabiliser la formation du « S-turn » (Alam, Grum-Tokars et al. 2005). La localisation du « S-turn » concorde donc avec l'endroit où les études de phosphorothioates ont

identifié au moins un site de liaison du magnésium (Sood, Beattie et al. 1998). Des études permettant de localiser exactement l'emplacement des ions magnésium dans le domaine de la boucle A730 sont en cours afin de vérifier cette hypothèse.

### 4.3 Rôle des pKas Modifiés dans le Site Actif du Ribozyme VS

La catalyse par acide/base générale est un mécanisme qui est régulièrement utilisé par les ribozymes et les protéines afin d'effectuer une réaction catalytique. Dans le cas des protéines, la présence de ce type de mécanisme implique souvent la présence de pKas modifiés, mais pas systématiquement, puisque certains acides aminés, comme les histidines, ont des pKas près du pH neutre. Dans le cas des ARNs, la présence de pKas modifiés est nécessaire, car, à la base, aucun nucléotide n'a un pKa près du pH physiologique. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer la valeur des pKas dans l'ARN. Entre autres, la présence de plusieurs groupements phosphates induit une charge négative intense locale qui peut stabiliser la forme protonée de certaines bases. D'un autre côté, la formation de certaines paires de bases intramoléculaires de type non Watson-Crick peut stabiliser la forme protonée des acides nucléiques. La valeur des pKas chez les bases azotées est également influencée par la désolvantisation « desolvation effect » et par la présence d'ions métalliques, comme le magnésium (Tang, Alexov et al. 2007).

Les études de RMN du carbone-13 ont démontré que le fragment SLVI contient deux pKas qui sont modifiés. Ceci est surprenant puisqu'un seul pKa modifié était attendu dans le domaine de la boucle A730. Néanmoins, ces données sont compatibles avec la structure de l'ARN SLVI. En effet, le premier pKa modifié appartient au A20 (A730) ( $pK_a = 4.7$ ), qui est impliqué dans la formation d'une paire de bases G-A symétrique. Cette paire de bases est normalement stabilisée par deux ponts hydrogène qui impliquent les atomes N1 et H6 de l'adénine A20, ainsi que les atomes H1 et O6 de la guanine G9. Du à la présence de ce pKa modifié, à pH 4.7, la moitié des molécules SLVI seront ionisées sur le N1, ce qui devrait causer l'abolition d'un des ponts hydrogène et entraîner la destruction de cette paire de bases. Ainsi, à bas pH, la paire de bases G-A ne se formera pas et le motif « S-turn » qui est présent

dans le site actif sera probablement détruit. La présence de ce pKa modifié est donc cohérente avec la diminution de l'activité catalytique qui est observée vers pH 5.0 (Smith and Collins 2007).

Quant au A8 (A756), il contient aussi un pKa qui est modifié, soit un pKa de 4.4. Ceci est surprenant, puisqu'un pKa entre 5.2 et 5.8 était attendu (Jones and Strobel 2003; Smith and Collins 2007; Wilson, McLeod et al. 2007). Cette légère variation entre la valeur obtenue et la valeur attendue peut être due à plusieurs facteurs. En effet, il est possible que l'isolation du fragment SLVI du reste du ribozyme modifie le pKa du A8. Dans le contexte du domaine catalytique replié, le A756 est probablement localisé dans un environnement qui est peu exposé au solvant, alors qu'il est largement exposé dans le fragment SLVI. Cet effet de désolvantisation pourrait expliquer la différence qui est observée. Par ailleurs, cette différence entre les pKas mesurés pour le A756 pourrait être due au fait que le pKa apparent mesuré par les études enzymatiques ne correspond pas au pKa de groupes individuels à l'état basal. Malgré le fait que les valeurs obtenues de façon enzymatique et spectroscopique ne concordent pas parfaitement, les données obtenues par RMN à partir du fragment SLVI supportent le rôle de la boucle interne dans une catalyse par acide/base générale, puisque le A756 a un pKa qui est considérablement différent des autres adénines.

Par ailleurs, la face Watson-Crick du résidu A8 (A756), qui contient les groupes importants pour la catalyse (Lafontaine, Wilson et al. 2001; Lafontaine, Wilson et al. 2002; Jones and Strobel 2003), est exposée au solvant dans la structure de l'ARN SLVI. L'atome N1, qui possède un pKa modifié, se retrouve donc exposé dans le sillon mineur et disponible pour interagir avec le substrat, tel que proposé dans le mécanisme de Wilson et Lilley à la figure 6.

Le dernier point important à mentionner est que la structure du fragment SLVI explique aussi le résultat de certaines expériences biochimiques effectuées précédemment par le groupe de Lilley (Lafontaine, Wilson et al. 2002). Dans ces expériences, l'adénine A756 a été excisée et un ribozyme abasique à la position 756 a été créé. L'ajout d'imidazole ou d'adénine exogène par la suite n'a pas suffi pour rétablir l'activité catalytique du ribozyme. La structure

du fragment SLVI permet de confirmer l'hypothèse émise par Lafontaine et al.. En effet, l'ablation du A756 provoque probablement l'affaissement d'une structure importante dans le site actif, ce qui peut entraîner la destruction du motif « S-turn ». Ceci explique clairement pourquoi des études subséquentes effectuées avec un ribozyme utilisant un pseudonucléotide contenant de l'imidazole à la place du A756 ont permis de conserver l'activité du ribozyme VS (Zhao, McLeod et al. 2005).

Bien que les études effectuées par RMN sur le fragment SLVI supportent le mécanisme de catalyse par acide/base général, il reste plusieurs questions non résolues à ce sujet, comme le rôle des ions magnésium dans cette réaction. Il est aussi essentiel de déterminer si le résidu A756 agit en tant qu'acide ou base général dans le mécanisme catalytique. Des études supplémentaires sont nécessaires pour obtenir des réponses à ces questions fondamentales.

#### **4.4 Comparaison Entre les Deux Structures du Site Actif**

Un ensemble de structures du fragment VSVI\_22, qui contient le site actif du ribozyme VS, a été déterminé précédemment par le groupe de Thorsten Dieckmann (Flinders and Dieckmann 2004). Cependant, les données biochimiques n'étaient pas en accord avec la structure moyenne obtenue. En effet, la structure secondaire de l'ARN utilisé pour ces études est différente de celle qui a été déterminée par les études de modifications chimiques et de mutagenèse dirigée. Il a donc été proposé que cette structure correspond à un état inactif et qu'un changement conformationnel prend place lors de la réaction pour défaire certaines paires de bases et remanier le site actif. Cette hypothèse est basée sur les résultats obtenus par des études de dynamique effectuées sur le fragment VSVI\_22 où la conformation du ribose du G8 (G729) oscille entre les états C2'-endo et C3'-endo. Le site actif du ribozyme VS subirait hypothétiquement un changement conformationnel similaire au mécanisme en fermeture éclair « zipper » qui a lieu dans la tige-boucle I (Andersen and Collins 2001). Les informations pouvant être extraites à partir de la structure VSVI\_22 sont donc limitées

puisqu'elle ne représente pas la conformation active du site actif dans le ribozyme VS de *Neurospora*.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de clivage du ribozyme VS, nous avons revisité la structure du site actif en créant un ARN qui conserve la structure secondaire déterminée par les études de modifications chimiques et de mutagenèse dirigée (figure 11). La structure du domaine de la boucle A730 que nous avons obtenue est donc très différente de celle déterminée par le groupe de Thorsten Dieckmann (Flinders and Dieckmann 2004). En effet, la structure secondaire du fragment SLVI que nous avons obtenue est conforme à celle qui a été déterminée par des études de mutagenèse dirigée et de modifications chimiques du ribozyme VS (figure 2). Nous avons ainsi observé la formation d'une paire de bases G9-A20 (G757-A730) symétrique dans le site actif et la présence de deux nucléotides qui sont exclus de l'hélice et exposés au solvant. Comparativement, la structure du fragment VSVI\_22 indiquait la présence de trois paires de bases non-canoniques (A+-C, G-A et G-U wobble) dans le site actif. Cette différence provient probablement du fait que l'ARN VSVI\_22 adopte une conformation « hairpin », sans boucle interne. Par ailleurs, nous avons aussi démontré l'existence d'un motif « S-turn » dans le fragment SLVI qui n'était pas présent dans la structure précédente. Étant donné que ce motif est connu pour lier les ions magnésium, son absence dans la structure de l'ARN VSVI\_22 explique probablement pourquoi l'ajout de magnésium n'avait aucun effet sur la structure secondaire de cet ARN.

Les deux structures du site actif ont donc très peu en commun sauf sur un point particulier. Dans les deux cas, le A730 a un pKa qui est modifié. Cependant, cette adénine est impliquée dans deux paires de bases très différentes, soit une A+-C dans le cas du fragment VSVI\_22 et une G-A symétrique dans le cas du fragment SLVI. L'importance biologique de cette observation est difficile à expliquer à partir des informations disponibles en ce moment.

En résumé, les deux structures obtenues pour le site actif du ribozyme VS sont très différentes puisqu'elles ne possèdent pas la même structure secondaire. Ces deux structures ont été calculées à partir de fragments isolés du ribozyme VS. Ceci démontre une fois de plus

l'importance de justifier, à l'aide d'études biochimiques, que la structure du fragment étudié est pertinente et représentative de la structure dans son contexte naturel. La structure du fragment SLVI étant consistante avec les études biochimiques effectuées à ce jour, il semble raisonnable d'affirmer que celle-ci représente une conformation active du ribozyme VS de *Neurospora*. Des études enzymatiques et cinétiques sur l'aptitude de clivage du fragment SLVI sont cependant en cours afin de corroborer cette affirmation (section 3.6).

## Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives

### 5.1 Conclusions

L'objectif principal de la recherche présentée dans ce mémoire était de mieux comprendre le mécanisme de clivage du ribozyme VS de *Neurospora* en obtenant une structure tridimensionnelle représentative du site actif. Pour ce faire, nous avons synthétisé un ARN, le fragment SLVI, qui contient la boucle A730, ainsi que les deux paires de bases adjacentes à chaque extrémité de la boucle. La structure tridimensionnelle de cet ARN a ensuite été déterminée par RMN en utilisant des méthodes homonucléaires et hétéronucléaires. La structure obtenue présente plusieurs caractéristiques intéressantes au niveau structural. La boucle interne A730 contient premièrement une paire de bases G-A symétrique qui n'a jamais été identifiée par des études biochimiques. Elle contient aussi deux nucléotides qui sont exclus de l'hélice « bulged » et exposés au solvant. Ces nucléotides sont donc libres d'interagir avec d'autres parties du ribozyme. Nous avons aussi découvert la présence d'un motif « S-turn » dans la structure du site actif. Cette découverte est plutôt intéressante, puisque ce motif est connu pour lier les ions magnésium de façon spécifique. Les études de phosphorothioates prédisent justement la présence de un ou plusieurs sites de liaison du magnésium à cet endroit. Par la suite, la structure de l'ARN SLVI a été comparée aux études biochimiques effectuées précédemment afin de s'assurer que la structure obtenue pour le fragment isolé est représentative de la structure présente dans le contexte du ribozyme entier. Les résultats des études biochimiques précédentes sont compatibles avec la structure obtenue. Nous proposons donc que la structure du fragment SLVI représente la structure du site actif du ribozyme VS de *Neurospora*.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des études de RMN utilisant le carbone-13 afin de prouver ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle le A756 participe comme acide ou base générale dans le mécanisme de clivage par transestérification. Les résultats obtenus, soit l'identification de deux pKa modifiés appartenant aux résidus A730 et A756 dans la structure du fragment SLVI supportent cette hypothèse. Ces résultats, ainsi que la structure

du fragment SLVI sont ainsi en accord avec le mécanisme proposé par le groupe de Lilley, qui utilise une catalyse par acide/base générale.

En conclusion, les études présentées dans ce mémoire nous ont permis d'approfondir nos connaissances fondamentales et structurales sur le site actif du ribozyme VS de *Neurospora*. Ces études nous ont aussi aidés à acquérir une meilleure compréhension de la relation entre la structure et la fonction, ainsi que de l'importance des ions métalliques chez les ribozymes en général.

## 5.2 Perspectives

Bien que les études présentées dans ce mémoire aident à mieux comprendre la structure et le rôle du site actif dans le ribozyme VS, il reste beaucoup de chemin à faire pour avoir une compréhension détaillée de cet ARN catalytique. En effet, les études structurales présentées dans ce mémoire ont soulevé plusieurs questions pour lesquelles il est important d'obtenir des réponses. Entre autres, il est essentiel de cerner le rôle des ions métalliques dans le mécanisme de clivage et le repliement du motif « S-turn ». Des études utilisant le manganèse comme ion paramagnétique sont d'ailleurs en cours afin de localiser avec précision les sites de liaisons du magnésium dans le domaine de la boucle A730. De plus, il est aussi crucial de démontrer par des études biochimiques que la structure obtenue pour le domaine de la boucle A730 dans l'ARN SLVI est représentative de la structure du site actif dans le ribozyme entier. Des études cinétiques et enzymatiques sont donc en cours afin de valider cet aspect de notre structure.

À plus long terme, il serait important de s'attarder au mécanisme catalytique proposé par le groupe de Lilley. En effet, certaines questions restent en suspend, comme la fonction du A756 dans le mécanisme de clivage : sert-il d'acide ou de base dans ce mécanisme de catalyse par acide/base générale? Des études similaires à celles effectuées sur le ribozyme « hairpin » devraient aider à éclaircir cette question. Sur un autre plan, il serait aussi important de vérifier si les pKa modifiés qui sont retrouvés dans le fragment SLVI (A730 et A756) sont



également présents dans le ribozyme entier. En effet, il est possible que le repliement tertiaire du ribozyme affecte les pKas de A730 et/ou A756, bien que ceux-ci soient déjà affectés par la structure locale. Au niveau du reste du ribozyme VS, il reste aussi beaucoup de travail à faire pour mieux comprendre le repliement tertiaire et les changements conformationnels qui ont lieu dans le domaine catalytique, le mécanisme de clivage, ainsi que l'impact des ions métalliques chez le ribozyme VS. Malgré plusieurs années d'efforts provenant de divers groupes de recherche, aucune structure cristallographique du ribozyme VS n'est disponible à ce jour. L'obtention de structures cristallines dans différents états serait très utile, car elle permettrait, entre autres, d'obtenir de nouvelles informations sur le repliement tertiaire du ribozyme, ainsi que sur le mécanisme de clivage. Une meilleure compréhension de tous ces aspects devrait nous aider à augmenter nos connaissances sur la relation entre la structure et la fonction chez les ARNs.

Annexe 1 : Attribution des Signaux de l'ARN SLVI

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS NON-ÉCHANGEABLES (ppm) (ppm +/- 0.01)										
	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	H2	H5	H6	H8
<b>G1</b>	5.61	4.76	4.64	4.30	4.02	3.91				7.99
<b>A2</b>	6.06	4.70	4.81	4.58	4.63	4.25	7.59			8.09
<b>G3</b>	5.72	4.46	4.50	4.50	4.53	4.13				7.38
<b>C4</b>	5.54	4.62	4.31	4.45	4.55	4.10		5.16	7.56	
<b>U5</b>	5.65	4.15	4.56	4.41	4.55	4.11		5.71	7.83	
<b>G6</b>	5.68	4.15	4.85	4.38	4.52	4.18				8.02
<b>C7</b>	5.94	4.47	4.65	4.46	4.33	4.25		5.68	7.83	
<b>A8</b>	6.18	4.74	4.98	4.65	4.37	4.32	8.24			8.58
<b>G9</b>	5.84	4.83	4.62	4.59	4.52	4.37				8.05
<b>C10</b>	5.53	4.45	4.72	4.54	4.55	4.25		5.25	7.67	
<b>A11</b>	5.95	4.44	4.81	4.55	4.63	4.26	7.34			8.14
<b>C12</b>	5.54	4.30	4.47	4.53	4.55	4.13		5.10	7.38	
<b>G13</b>	5.74	4.33	4.70	4.40	4.44	4.16				7.44
<b>A14</b>	5.67	4.77	4.44	4.22	4.30	3.95	7.74			8.33
<b>A15</b>	5.39	4.37	4.56	4.35	4.26	3.96	7.70			7.89
<b>A16</b>	5.99	4.55	4.90	4.45	4.64	4.26	8.21			8.14
<b>G17</b>	3.57	4.21	4.09	4.21	4.31	4.21				7.98
<b>U18</b>	5.54	4.63	4.31	4.45	4.57	4.11		5.04	7.80	
<b>G19</b>	5.71	4.54	4.69	4.52	4.58	4.19				7.71
<b>A20</b>	5.92	4.66	4.57	4.56	4.63	4.23	7.88			7.94
<b>C21</b>	5.36	4.31	4.53	4.41	4.56	4.15		5.44	7.64	
<b>G22</b>	5.75	4.64	4.58	4.52	4.49	4.15				7.50
<b>G23</b>	5.65	4.45	4.57	4.44	4.58	4.13				7.33
<b>C24</b>	5.55	4.39	4.48	4.44	4.58	4.10		5.25	7.72	
<b>U25</b>	5.62	4.39	4.55	4.44	4.58	4.12		5.46	7.97	
<b>C26</b>	5.85	4.04	4.21	4.22	4.56	4.11		5.73	7.81	

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES ATOMES DE CARBONES (ppm)										
(ppm +/- 0.4)										
	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C2	C5	C6	C8	5'-P
<b>G1</b>	92.6	75.1	75.5	84.6	62.2				138.8	
<b>A2</b>	92.8	75.6	72.7	82.1	64.8	153.4			140.0	
<b>G3</b>	92.5	75.4	72.7	81.8	65.3				135.8	
<b>C4</b>	93.7	75.3	72.0	82.0	64.3		97.1	140.6		
<b>U5</b>	94.7	75.5	73.0	82.8	65.2		105.9	141.3		
<b>G6</b>	90.2	77.1	75.5	83.6	65.9				138.7	
<b>C7</b>	92.4	76.2	74.5	83.1	66.0		98.3	142.7		
<b>A8</b>	89.9	77.6	77.4	86.1	67.3	155.6			141.8	
<b>G9</b>	93.1	75.4	74.0	83.4	66.5				139.2	
<b>C10</b>	94.4	75.2	72.0	82.3	64.7		97.2	141.0		
<b>A11</b>	92.7	75.6	72.2	81.9	64.7	153.3			139.6	
<b>C12</b>	93.0	75.9	71.9	82.3	64.3		97.5	139.4		
<b>G13</b>	93.7	75.8	71.7	81.9	64.3				136.1	
<b>A14</b>	93.1	75.5	72.5	83.0	63.7	154.0			142.1	
<b>A15</b>	93.1	75.6	73.0	82.8	64.4	154.4			139.9	
<b>A16</b>	91.8	76.3	72.8	82.1	65.0	155.8			140.0	
<b>G17</b>	93.4	74.5	74.6	82.7	69.4				137.7	
<b>U18</b>	93.4	75.1	72.1	81.9	64.5		102.4	141.6		
<b>G19</b>	92.5	75.5	73.1	82.0	65.1				136.6	
<b>A20</b>	92.7	75.5	72.7	82.1	65.0	154.6			139.0	
<b>C21</b>	93.1	75.7	72.1	81.8	64.3		98.6	139.7		
<b>G22</b>	92.8	75.3	72.8	82.0	65.3				136.2	
<b>G23</b>	92.8	75.3	72.5	82.2	64.5				136.0	
<b>C24</b>	93.9	75.4	71.9	81.7	64.3		97.1	141.0		
<b>U25</b>	93.9	75.4	72.1	81.8	64.3		103.3	142.2		
<b>C26</b>	92.9	77.5	69.7	83.3	65.2		98.0	142.1		

<b>DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS ÉCHANGEABLES (ppm)</b>								
<b>RÉSIDUS</b>	<b>H1<sup>a</sup></b>	<b>H21<sup>a</sup></b>	<b>H22<sup>a</sup></b>	<b>H3<sup>a</sup></b>	<b>H41<sup>a</sup></b>	<b>H42<sup>a</sup></b>	<b>H61<sup>a</sup></b>	<b>H62<sup>a</sup></b>
<b>G1</b>	12.19							
<b>A2</b>								
<b>G3</b>	13.51							
<b>C4</b>					8.35	6.73		
<b>U5</b>				11.51				
<b>G6</b>	13.08							
<b>C7</b>								
<b>A8</b>							6.80	6.80
<b>G9</b>		6.07	6.07					
<b>C10</b>					8.22	6.75		
<b>A11</b>								
<b>C12</b>					8.11	6.54		
<b>G13</b>	10.54							
<b>A14</b>							6.37	6.37
<b>A15</b>							6.35	6.35
<b>A16</b>								
<b>G17</b>	12.83							
<b>U18</b>				13.97				
<b>G19</b>	12.01							
<b>A20</b>								
<b>C21</b>					8.50	6.81		
<b>G22</b>	10.70	5.91	5.91					
<b>G23</b>	13.44							
<b>C24</b>					8.54	6.86		
<b>U25</b>				14.38				
<b>C26</b>					8.22	6.95		

DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES ATOMES D'AZOTE (ppm)								
RÉSIDUS	N1 <sup>b</sup>	N2 <sup>c</sup>	N3 <sup>d</sup>	N4 <sup>c</sup>	N6 <sup>e</sup>	N7 <sup>e</sup>	N9 <sup>e</sup>	
G1	145.9					231.3	169.7	
A2	221.4		213.1		82.4	228.7	171.2	
G3	148.2	75.6				233.7	169.7	
C4	151.7		196.1	99.0				
U5	146.1		158.0					
G6	148.1					235.7	170.0	
C7	152.6							
A8	226.0		217.1		79.1	232.7	168.9	
G9		71.8				233.1	169.8	
C10	151.6		198.1	97.0				
A11	220.9		213.3		83.8	230.3	171.3	
C12	150.7		195.4	99.2				
G13	145.5	75.8				230.1		
A14	224.5		215.9		78.8	228.4	169.9	
A15	227.3		214.7		80.4	225.9	170.4	
A16	226.8		215.6		80.9	231.6	173.0	
G17	147.2	75.3				232.0	169.5	
U18	146.5		162.3					
G19	146.8	74.7				234.2		
A20	222.8		213.1		84.9	230.3	171.1	
C21	150.8		197.7	99.6				
G22	142.9	72.2				234.5	170.4	
G23	148.5	76.5				233.6	169.9	
C24	151.2		197.1	99.7				
U25	146.9		162.7					
C26	152.9		197.4	97.3				

a. +/- 0.01 ppm.

b. +/- 0.1 ppm pour les uridines et les cytosines, 0.2 ppm pour les adenines.

c. +/- 0.1 ppm.

d. +/- 0.1 ppm pour les uridines, 0.2 ppm pour les adenines and 0.5 ppm pour les cytosines.

e. +/- 0.2 ppm.

## Références

- Alam, S., V. Grum-Tokars, et al. (2005). "Conformational heterogeneity at position U37 of an all-RNA hairpin ribozyme with implications for metal binding and the catalytic structure of the S-turn." Biochemistry **44**(44): 14396-408.
- Alifano, P., F. Rivellini, et al. (1994). "Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA." Genes Dev **8**(24): 3021-31.
- Andersen, A. and R. A. Collins (2000). "Rearrangement of a stable RNA secondary structure during VS ribozyme catalysis." Mol. Cell **5**: 469-478.
- Andersen, A. A. and R. A. Collins (2001). "Intramolecular secondary structure rearrangement by the kissing interaction of the *Neurospora* VS ribozyme." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(14): 7730-7735.
- Beattie, T. L., J. E. Olive, et al. (1995). "A secondary-structure model for the self-cleaving region of *Neurospora* VS RNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 4686-4690.
- Bravo, C., A. Woisard, et al. (1999). "A Y form of hammerhead ribozyme trapped by photo-cross-links retains full cleavage activity." Biochimie **81**(3): 201-12.
- Brünger, A. T. (1992). X-PLOR 3.1 Manual. New Haven, CT, Yale University Press.
- Campbell, D. O., P. Bouchard, et al. (2006). "NMR structure of Varkud satellite ribozyme stem-loop V in the presence of magnesium ions and localization of metal-binding sites." Biochemistry **45**(35): 10591-605.
- Campbell, D. O. and P. Legault (2005). "NMR structure of the Varkud satellite ribozyme stem-loop V RNA and magnesium-ion binding from chemical-shift mapping." Biochemistry **44**: 4157-4170.
- Collier, A. J., J. Gallego, et al. (2002). "A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site." Nat Struct Biol **9**(5): 375-80.
- Collins, R. A. and J. E. Olive (1993). "Reaction conditions and kinetics of self-cleavage of a ribozyme derived from *Neurospora* VS RNA." Biochemistry **32**: 2795-2799.
- Correll, C. C., I. G. Wool, et al. (1999). "The two faces of the Escherichia coli 23 S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution." J Mol Biol **292**(2): 275-87.
- Cowan, J. A. (1993). "Metallobiochemistry of RNA.  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  as a probe for  $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$  binding sites." J. Inorg. Biochem. **49**: 171-175.
- Cozzzone, P. J. and O. Jardetzky (1977). "The mechanism of purine polynucleotide hydrolysis by ribonuclease A." FEBS Lett **73**(1): 77-9.
- Crick, F. H. (1968). "The origin of the genetic code." J Mol Biol **38**(3): 367-79.
- Dahm, S. C., W. B. Derrick, et al. (1993). "Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism." Biochemistry **32**(48): 13040-5.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, et al. (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." J. Biomol. NMR **6**: 277-293.
- Dingley, A. J. and S. Grzesiek (1998). "Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide  $^2\text{J}_{\text{NN}}$  couplings." J. Am. Chem. Soc. **120**: 8293-8297.
- Draper, D. E. (1996). "Strategies for RNA folding." Trends Biochem Sci **21**(4): 145-9.
- Ehresmann, C., F. Baudin, et al. (1987). "Probing the structure of RNAs in solution." Nucleic Acids Res **15**(22): 9109-28.
- Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." Nature **346**(6287): 818-22.

- Erat, M. C., O. Zerbe, et al. (2007). "Solution structure of domain 6 from a self-splicing group II intron ribozyme: a Mg(2+) binding site is located close to the stacked branch adenosine." Chembiochem **8**(3): 306-14.
- Fedor, M. J. and J. R. Williamson (2005). "The catalytic diversity of RNAs." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 399-412.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Flinders, J. and T. Dieckmann (2001). "A pH controlled conformational switch in the cleavage site of the VS ribozyme substrate RNA." J. Mol. Biol. **308**: 665-679.
- Flinders, J. and T. Dieckmann (2004). "The solution structure of the VS ribozyme active site loop reveals a dynamic "hot-spot". " J. Mol. Biol. **341**: 935-949.
- Furtig, B., C. Richter, et al. (2003). "NMR spectroscopy of RNA." Chembiochem **4**(10): 936-62.
- Gilbert, J. C., T. DeFeo-Fraulini, et al. (2007). "First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers." Circulation **116**(23): 2678-86.
- Green, P. J., O. Pines, et al. (1986). "The role of antisense RNA in gene regulation." Annu Rev Biochem **55**: 569-97.
- Griffiths, A. D., B. V. Potter, et al. (1987). "Stereospecificity of nucleases towards phosphorothioate-substituted RNA: stereochemistry of transcription by T7 RNA polymerase." Nucleic Acids Res **15**(10): 4145-62.
- Grzesiek, S. and A. Bax (1993). "The importance of not saturating water in protein NMR. Application to sensitivity enhancement of NOE measurements." J. Am. Chem. Soc. **115**: 12593-12594.
- Guo, H. C. T., D. M. De Abreu, et al. (1993). "Nucleotide sequence requirements for self-cleavage of *Neurospora* VS RNA." J. Mol. Biol. **232**: 351-361.
- Hiley, S. L. and R. A. Collins (2001). "Rapid formation of a solvent-inaccessible core in the *Neurospora* Varkud satellite ribozyme." EMBO J. **20**(19): 5461-5469.
- Hiley, S. L., V. D. Sood, et al. (2002). "4-thio-U cross-linking identifies the active site of the VS ribozyme." EMBO J. **21**(17): 4691-4698.
- Hoffmann, B., G. T. Mitchell, et al. (2003). "NMR structure of the active conformation of the Varkud satellite ribozyme cleavage site." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**(12): 7003-7008.
- Ikura, M., L. E. Kay, et al. (1990). "Three-dimensional NOESY-HMQC spectroscopy of a <sup>13</sup>C-labeled protein." J. Magn. Reson. **86**: 204-209.
- Jaffe, E. K. and M. Cohn (1979). "Diastereomers of the nucleoside phosphorothioates as probes of the structure of the metal nucleotide substrates and of the nucleotide binding site of yeast hexokinase." J Biol Chem **254**(21): 10839-45.
- Jaikaran, D., M. D. Smith, et al. (2008). "An important role of G638 in the cis-cleavage reaction of the *Neurospora* VS ribozyme revealed by a novel nucleotide analog incorporation method." Rna.
- Johnson, B. A. and R. A. Blevins (1994). "NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data." J. Biomol. NMR **4**: 603-614.
- Johnston, W. K., P. J. Unrau, et al. (2001). "RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension." Science **292**(5520): 1319-25.
- Jones, F. D., S. P. Ryder, et al. (2001). "An efficient ligation reaction promoted by a Varkud satellite ribozyme with extended 5'- an 3'-termini." Nucleic Acids Res. **29**(24): 5115-5120.

- Jones, F. D. and S. A. Strobel (2003). "Ionization of a critical adenosine residue in the *Neurospora* Varkud satellite ribozyme active site." *Biochemistry* **42**: 4265-4276.
- Jucker, F. M., H. A. Heus, et al. (1996). "A network of heterogeneous hydrogen bonds in GNRA tetraloops." *J Mol Biol* **264**(5): 968-80.
- Kao, C., M. Zheng, et al. (1999). "A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3' terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase." *RNA* **5**: 1268-1272.
- Kay, L. E., P. Keifer, et al. (1992). "Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity." *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 10663-10665.
- Keiper, S., D. Bebenroth, et al. (2004). "Architecture of a Diels-Alderase ribozyme with a preformed catalytic pocket." *Chem Biol* **11**(9): 1217-27.
- Kennell, J. C., B. J. Saville, et al. (1995). "The VS catalytic RNA replicates by reverse transcription as a satellite of a retroplasmid." *Genes & Devel.* **9**: 294-303.
- Lafontaine, D. A., D. G. Norman, et al. (2001). "Structure, folding and activity of the VS ribozyme: importance of the 2-3-6 helical junction." *EMBO J.* **20**(6): 1415-1424.
- Lafontaine, D. A., D. G. Norman, et al. (2002). "The global structure of the VS ribozyme." *EMBO J.* **21**(10): 2461-2471.
- Lafontaine, D. A., T. J. Wilson, et al. (2001). "The A730 loop is an important component of the active site of the VS ribozyme." *J. Mol. Biol.* **312**: 663-674.
- Lafontaine, D. A., T. J. Wilson, et al. (2002). "Functional group requirements in the probable active site of the VS ribozyme." *J. Mol. Biol.* **323**: 23-34.
- Lau, M. W., K. E. Cadieux, et al. (2004). "Isolation of fast purine nucleotide synthase ribozymes." *J Am Chem Soc* **126**(48): 15686-93.
- Legault, P. (1995). Structural studies of ribozymes by heteronuclear NMR spectroscopy. Boulder, University of Colorado at Boulder.
- Legault, P. and A. Pardi (1994). "In situ probing of adenine protonation in RNA by <sup>13</sup>C NMR." *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 8390-8391.
- Li, M., H. Li, et al. (2006). "RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy." *Ann N Y Acad Sci* **1082**: 172-9.
- Lilley, D. M. (2004). "The Varkud satellite ribozyme." *RNA* **10**: 151-158.
- Lindqvist, M., K. Sandstrom, et al. (2001). "Specific metal-ion binding sites in a model of the P4-P6 triple-helical domain of a group I intron." *Rna* **7**(8): 1115-25.
- Lukavsky, P. J., I. Kim, et al. (2003). "Structure of HCV IRES domain II determined by NMR." *Nat Struct Biol* **10**(12): 1033-8.
- Maguire, J. L. and R. A. Collins (2001). "Effects of cobalt hexammine on folding and self-cleavage of the *Neurospora* VS ribozyme." *J. Mol. Biol.* **309**: 45-56.
- Martick, M. and W. G. Scott (2006). "Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis." *Cell* **126**(2): 309-20.
- Michiels, P. J. A., C. H. J. Schouten, et al. (2000). "Structure of the ribozyme substrate hairpin of *Neurospora* VS RNA: A close look at the cleavage site." *RNA* **6**: 1821-1832.
- Milligan, J. F., D. R. Groebe, et al. (1987). "Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates." *Nucleic Acids Res.* **15**: 8783-8798.
- Mueller, L., P. Legault, et al. (1995). "Improved RNA structure determination by detection of NOE contacts to exchange-broadened amino groups." *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 11043-11048.
- Muller, U. F. (2006). "Re-creating an RNA world." *Cell Mol Life Sci* **63**(11): 1278-93.



- Murray, J. B., A. A. Seyhan, et al. (1998). "The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone." Chem. & Biol. **5**: 587-595.
- Nelson, J. A. and O. C. Uhlenbeck (2006). "When to believe what you see." Mol Cell **23**(4): 447-50.
- Ngok, F. K., R. T. Mitsuyasu, et al. (2004). "Clinical gene therapy research utilizing ribozymes: application to the treatment of HIV/AIDS." Methods Mol Biol **252**: 581-98.
- Nixon, P. L., C. A. Theimer, et al. (1999). "Thermodynamics of stabilization of RNA pseudoknots by cobalt(III) hexaammine." Biopolymers **50**(4): 443-58.
- Orgel, L. E. (1968). "Evolution of the genetic apparatus." J Mol Biol **38**(3): 381-93.
- Pardi, A. and E. P. Nikonowicz (1992). "Simple procedure for resonance assignment of the sugar protons in  $^{13}\text{C}$ -labeled RNAs." J. Am. Chem. Soc. **114**: 9202-9203.
- Pecoraro, V. L., J. D. Hermes, et al. (1984). "Stability constants of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of  $\text{MgATP}$  and  $\text{MgADP}$ ." Biochemistry **23**(22): 5262-71.
- Perrotta, A. T., I. Shih, et al. (1999). "Imidazole rescue of a cytosine mutation in a self-cleaving ribozyme." Science **286**(5437): 123-6.
- Piotto, M., V. Saudek, et al. (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions." J. Biomol. NMR **2**: 661-665.
- Rance, M., O. W. Sorensen, et al. (1983). "Improved spectral resolution in cosy  $^1\text{H}$  NMR spectra of proteins via double quantum filtering." Biochem Biophys Res Commun **117**(2): 479-85.
- Rastogi, T., T. L. Beattie, et al. (1996). "A long-range pseudoknot is required for activity of the *Neurospora* VS ribozyme." EMBO J. **15**(11): 2820-2825.
- Roberts, C. K. G. (1993). NMR of macromolecules. New York, Oxford University Press.
- Rossi, J. J., C. H. June, et al. (2007). "Genetic therapies against HIV." Nat Biotechnol **25**(12): 1444-54.
- Ruffner, D. E., S. C. Dahm, et al. (1989). "Studies on the hammerhead RNA self-cleaving domain." Gene **82**(1): 31-41.
- Rupert, P. B. and A. R. Ferré-D'Amaré (2001). "Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis." Nature **410**: 780-786.
- Rupert, P. B., A. P. Massey, et al. (2002). "Transition state stabilization by a catalytic RNA." Science **298**(5597): 1421-4.
- Saenger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure. New York, Springer-Verlag.
- Sashital, D. G., V. Venditti, et al. (2007). "Structure and thermodynamics of a conserved U2 snRNA domain from yeast and human." Rna **13**(3): 328-38.
- Saville, B. J. and R. A. Collins (1990). "A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria." Cell **61**: 685-696.
- Saville, B. L. and R. A. Collins (1991). "RNA-mediated ligation of self-cleavage products of a *Neurospora* mitochondrial plasmid transcript." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 8826-8830.
- Scherer, L., J. J. Rossi, et al. (2007). "Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection." Gene Ther **14**(14): 1057-64.
- Schwalbe, H., J. P. Marino, et al. (1994). "Determination of a complete set of coupling constants in  $^{13}\text{C}$ -labeled oligonucleotides." J. Biomol. NMR **4**: 631-644.
- Scott, L. G. and M. Hennig (2008). "RNA structure determination by NMR." Methods Mol Biol **452**: 29-61.
- Scott, W. G. (2007). "Ribozymes." Curr Opin Struct Biol **17**(3): 280-6.

- Seelig, B. and A. Jaschke (1999). "A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity." Chem Biol **6**(3): 167-76.
- Sengle, G., A. Eisenfuhr, et al. (2001). "Novel RNA catalysts for the Michael reaction." Chem Biol **8**(5): 459-73.
- Serganov, A. and D. J. Patel (2007). "Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins." Nat Rev Genet **8**(10): 776-90.
- Shih, I. H. and M. D. Been (2001). "Involvement of a cytosine side chain in proton transfer in the rate-determining step of ribozyme self-cleavage." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1489-94.
- Sigel, R. K. and A. M. Pyle (2007). "Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry." Chem Rev **107**(1): 97-113.
- Simorre, J. P., G. R. Zimmermann, et al. (1996). "Correlation of the guanosine exchangeable and non-exchangeable base protons in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled RNA with an HNC-TOCSY-CH experiment." J. Biomol. NMR **7**: 153-156.
- Simorre, J. P., G. R. Zimmermann, et al. (1996). "Triple-resonance experiments for assignment of adenine base resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled RNA." J. Am. Chem. Soc. **118**: 5316-5317.
- Simorre, J. P., G. R. Zimmermann, et al. (1995). "Triple resonance HNCCCH experiments for correlating exchangeable and non-exchangeable cytidine and uridine base protons in RNA." J. Biomol. NMR **6**: 427-432.
- Skleňár, V., T. Dieckmann, et al. (1998). "Optimization of triple-resonance HCN experiments for application to larger RNA oligonucleotides." J. Magn. Reson. **130**: 119-124.
- Smith, J. S. and E. P. Nikonowicz (1998). "NMR structure and dynamics of an RNA motif common to the spliceosome branch-point helix and the RNA-binding site for phage GA coat protein." Biochemistry **37**(39): 13486-98.
- Smith, M. D. and R. A. Collins (2007). "Evidence for proton transfer in the rate-limiting step of a fast-cleaving Varkud satellite ribozyme." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5818-23.
- Sood, V. D., T. L. Beattie, et al. (1998). "Identification of phosphate groups involved in metal binding and tertiary interactions in the core of the *Neurospora* VS ribozyme." J. Mol. Biol. **282**: 741-750.
- Sood, V. D. and R. A. Collins (2001). "Functional equivalence of the uridine turn and the hairpin as building blocks of tertiary structure in the *Neurospora* VS ribozyme." J. Mol. Biol. **313**: 1013-1019.
- Sood, V. D., S. Yekta, et al. (2002). "The contribution of 2'-hydroxyls to the cleavage activity of the *Neurospora* VS ribozyme." Nucleic Acids Res. **30**(5): 1132-1138.
- Stahley, M. R. and S. A. Strobel (2005). "Structural evidence for a two-metal-ion mechanism of group I intron splicing." Science **309**: 1587-1590.
- Steitz, T. A. and J. A. Steitz (1993). "A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6498-502.
- Strobel, S. A., F. D. Jones, et al. (2003). "Biochemical detection of adenosine and cytidine ionization within RNA by interference analysis." Nucleic Acids Res Suppl(3): 229-30.
- Stryer, L. and R. P. Haugland (1967). "Energy transfer: a spectroscopic ruler." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 719-26.
- Sullenger, B. A. and E. Gilboa (2002). "Emerging clinical applications of RNA." Nature **418**(6894): 252-8.
- Szewczak, A. A., P. B. Moore, et al. (1993). "The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9581-5.

- Tang, C. L., E. Alexov, et al. (2007). "Calculation of pKas in RNA: on the structural origins and functional roles of protonated nucleotides." J Mol Biol **366**(5): 1475-96.
- Tarasow, T. M., S. L. Tarasow, et al. (1997). "RNA-catalysed carbon-carbon bond formation." Nature **389**(6646): 54-7.
- Thill, G., M. Blumenfeld, et al. (1991). "Self-cleavage of a 71 nucleotide-long ribozyme derived from hepatitis delta virus genomic RNA." Nucleic Acids Res **19**(23): 6519-25.
- Thompson, J. E., F. D. Venegas, et al. (1994). "Energetics of catalysis by ribonucleases: fate of the 2',3'-cyclic phosphodiester intermediate." Biochemistry **33**(23): 7408-14.
- Tzakos, A. G., C. R. Grace, et al. (2006). "NMR techniques for very large proteins and RNAs in solution." Annu Rev Biophys Biomol Struct **35**: 319-42.
- Unrau, P. J. and D. P. Bartel (1998). "RNA-catalysed nucleotide synthesis." Nature **395**(6699): 260-3.
- van der Krol, A. R., J. N. Mol, et al. (1988). "Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences." Biotechniques **6**(10): 958-76.
- Vinore, S. A. (2006). "Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration." Int J Nanomedicine **1**(3): 263-8.
- Wijmenga, S. S., M. M. W. Mooren, et al. (1993). NMR of nucleic acids; from spectrum to structure. NMR of macromolecules: a practical approach. G. C. K. Roberts. New York, Oxford University Press. **134**: 217-288.
- Wilson, T. J., A. C. McLeod, et al. (2007). "A guanine nucleobase important for catalysis by the VS ribozyme." EMBO J **26**(10): 2489-500.
- Wimberly, B., G. Varani, et al. (1993). "The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA." Biochemistry **32**(4): 1078-87.
- Woese, C. R. (2001). "Translation: in retrospect and prospect." Rna **7**(8): 1055-67.
- Zamel, R., A. Poon, et al. (2004). "Exceptionally fast self-cleavage by a *Neurospora* Varkud satellite ribozyme." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1467-72.
- Zhao, Z. Y., A. McLeod, et al. (2005). "Nucleobase participation in ribozyme catalysis." J Am Chem Soc **127**(14): 5026-7.

